



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**TESE**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CERCOSPORA E  
EFICIÊNCIA DA TOXINA CERCOSPORINA NA SELEÇÃO DE  
GENÓTIPOS DE PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS**

**ALINE DA SILVA SANTOS**

**2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CERCOSPORA E  
EFICIÊNCIA DA TOXINA CERCOSPORINA NA SELEÇÃO DE  
GENÓTIPOS DE PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS**

**ALINE DA SILVA SANTOS**

*Sob a Orientação do Professor*

**Mailson Monteiro do Rêgo**

Tese submetida como requisito para  
obtenção do grau de **Doutor em  
Agronomia**, no Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia

Areia, PB

Maio de 2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

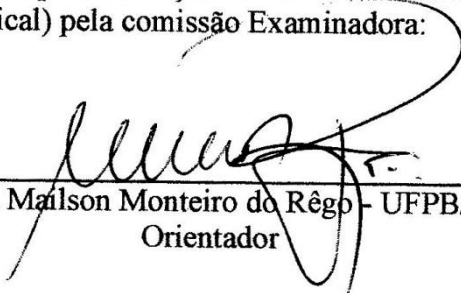
**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

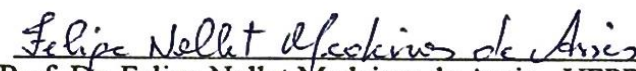
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

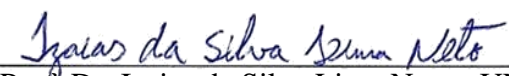
**TÍTULO:** CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CERCOSPORA E EFICIÊNCIA DA TOXINA CERCOSPORINA NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS

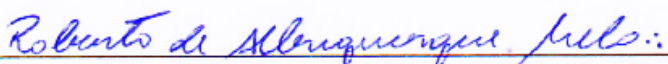
**AUTORA:** ALINE DA SILVA SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA em AGRONOMIA (Agricultura Tropical) pela comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo - UFPB/CCA  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Felipe Nollat Medeiros de Assis - UFPB/CCA  
Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Izaias da Silva Lima Neto - UNIVASF  
Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Roberto de Albuquerque Melo - UFRPE.  
Examinador

Data de realização: 29 de maio de 2015

Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. Mailson Monteiro do Rêgo  
Orientador

“Minha fé é no desconhecido, em tudo  
que não podemos compreender por  
meio da razão. Creio que o que está  
acima do nosso entendimento é apenas  
um fato em outras dimensões  
e que no reino do desconhecido há uma  
infinita reserva de poder.”

(Charles Chaplin)

A meu filho Guilherme Augusto Mendes Silva, que apesar da distância sempre me apoiou com sua paciência, dando-me forças para dar continuidade aos estudos e à minha mãe Hildemira Mendes da Silva Santos, meu porto seguro, que desde o início da vida acadêmica esteve presente ao meu lado proporcionando-me todas as condições para que eu chegasse até aqui.

### **Dedico**

Ao meu pai Arionildo Rodrigues dos Santos (*In memória*), meu irmão, minhas irmãs e sobrinhos por todo o apoio, amor e carinho.

### **Ofereço**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e força nos momentos de fraqueza.

À Universidade Federal da Paraíba-UFPB, em especial, a todo o corpo docente da Pós-graduação em Agronomia, pelos ensinamentos proporcionados, os quais foram essenciais durante as atividades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Mailson Monteiro do Rêgo, pela orientação, ensinamentos e confiança depositada para realização de todos os experimentos da tese.

Ao Professor Dr. Manoel Abilio de Queiróz, pelo apoio, incentivo e acolhimento que foi essencial para meu crescimento profissional.

À Professora Dra. Elizanilda Ramalho do Rêgo, pelos ensinamentos transmitidos durante o doutorado.

Às Professoras Dra. Ana Rosa Peixoto e Dra Luciana Cordeiro do Nascimento, pela ajuda e por ter cedido um espaço no Laboratório de Fitopatologia na UNEB e na UFPB para o desenvolvimento dos trabalhos da tese.

Ao amigo Lucas Chaves Cavalcante, pelo grande apoio e auxílio na condução dos experimentos e pela convivência e paciência durante e após a realização da pesquisa.

À Gláucia Djojânia Azevêdo Medeiros, Karmita Thainá Correia Ferreira, Giovana Patrícia dos Santos Sales, Tayron Rayan Sobrinho Costa, Ângela Maria dos Santos Pessoa pelo grande auxílio nos trabalhos da tese.

Aos amigos, Família BIOMASSA, pela ajuda, apoio e amizade durante o percurso do doutorado, pessoas especiais que entraram em minha vida.

À Márcia Adriana Carvalho dos Santos, amiga que caminha comigo desde a graduação, pelo apoio, incentivo e sua amizade.

À amiga Carmem Valdenia da Silva Santana, pelo grande apoio e incentivos nos momentos difíceis.

A meu namorado Vinícius Evangelista Alves de Oliveira, pela força, apoio, paciências e incentivo nos momentos difíceis.

À minha família, que é meu alicerce, por tudo que cada um representa em minha vida, por todo o amor, incentivo e paciência que tiveram e têm comigo. Sem vocês, não conseguiria alcançar mais esse objetivo em minha vida.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho de Tese,

**MUITO OBRIGADA!!!**



SANTOS, A.S. **Caracterização morfológica de cercospora e eficiência da toxina cercosporina na seleção de genótipos de pimenteiros ornamentais.** 2015 55f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2015.

## RESUMO

A cercosporiose é uma grave doença fúngica de plantas do gênero *Capsicum*, causada por fungos do gênero *Cercospora*, que se caracterizam por produzir uma toxina, a cercosporina, de coloração vermelha de alta toxidez aos tecidos vegetais. Com isso, o objetivo do trabalho foi realizar a caracterização da doença em plantas de pimenteiros ornamentais, bem como, testar a eficiência da toxina cercosporina na seleção de genótipos de pimenteiros ornamentais. Para isso, procedeu-se a coleta de órgãos infectados de plantas de pimenteiros ornamentais cultivadas em casa de vegetação, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba - UFPB/CCA, Campus II, Areia – PB. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biotecnologia da UFPB/CCA, para a caracterização morfológica do fungo. A caracterização da doença foi realizada observando plantas com sintomas da doença. Para testar a eficiência da cercosporina, realizou-se a indução da produção de cercosporina em colônias fúngicas cultivadas em diferentes meios de cultura à base de leite de coco (LCO), água de coco (ACO), suco V8 (A-V8), extrato de folhas de pimenteiros (A-P) e água-ágar (A-A). Em seguida, identificou-se a toxina através da mudança de coloração para verde da solução fúngica em contato com o meio alcalino KOH 5N. Após a identificação foi realizada a quantificação e a extração da cercosporina, com auxílio da solução extratora Tris-HCl com pH 6,8. A quantificação da toxina foi feita pelo método de Bradford, procedendo a sua inoculação em folhas de sete genótipos de pimenteiros utilizando a concentração que melhor expressou os sintomas. Analisando os dados, observou-se que estruturas fúngicas presentes em lesões de pimenteiros foram semelhantes às descritas para o fungo *Cercospora capsici*, e confirmando como causador de cercosporiose pelo postulado de Koch. O método de isolamento direto possibilitou a obtenção do fungo em todas as partes vegetais e o método indireto utilizando os ramos. O meio à base de ágar-água promoveu o maior crescimento micelial e o meio à base de extrato de folhas de pimenteira o maior tamanho da colônia. O meio ACO promoveu a expansão da toxina em toda a placa de *Petri* e obteve a maior quantidade de cercosporina por disco micelial. Todos os meios, com exceção do meio A-A, induziram a produção de cercosporina. Os meios à base de leite de coco e extrato de folha de pimenteira com e sem geleificante apresentaram as maiores produções de toxina. Os isolados cultivados no meio A-A produziram quantidades de cercosporina iguais aos dos isolados cultivados nos meios LCO e P-A com geleificantes. As concentrações da toxina 40 e 50% foram as que melhor expressaram os sintomas de cercosporiose. Os genótipos UFPB 131, UFPB 132 e UFPB 358 apresentaram tolerância à toxina cercosporina.

**Palavras-chave:** *Capsicum annuum*; *Cercospora capsici*; avaliação de genótipos.

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION CERCOSPORA MORPHOLOGICAL AND TOXIN EFFICIENCY IN GENOTYPES CERCOSPORIN SELECTION CHILI ORNAMENTAL

The Cercospora leaf spot is an serious fungal disease of plants of the genus *Capsicum*, it is caused by fungi of genus *Cercospora*, which produce a toxin, the cercosporin, that has a red coloration which is very toxic to the plant tissues. Therefore, this work purpose was realize a characterization of this disease in ornamental chili plants, as well as, try the efficiency of cercosporin toxin in the genotype of chili ornamental plants. Therefore, it has proceeded an organs collet of infected organs by ornamental chili plants grown in a greenhouse, located in the Science Center Agrarian of Federal University of Paraíba – UFPB/CCA, Campus II, Areia – PB. The samples were taken to the Biotechnology Laboratory of UFPB/CCA for a morphological characterization of the fungus. The disease characterization was did observing plants with symptoms of the disease. To test the efficiency of the cercosporin, it was realized an induction of the production of cercosporin in fungi colonies grown in different in various culture media having as the base coconut milk (LCO), coconut water (ACO), V8 juice (A-V8), leaf extract of pepper (A – P), and water agar (A-A). After that, the toxin was identified throw de change of coloration to green of the fungal solution in contact with the alkaline way, KOH 5N. After this moment of identification, it was realized a quantification and an extraction of cercosporin with the aid of extractor solution Tris-HCl that has pH 6,8. The toxin quantification was made using the Bradford method, proceeding its inoculation in leaves of seven genotypes of chili plants using the concentration that best expressed the symptoms. When the results was analyzed, it has observed that fungous structure was the same kind of the description of the *cercospora capsici* fungi, which is the responsible for the Cercospora leaf spot has said the Koch postulate. Direct isolation method has given the possibility the achievement of fungus in all plants parts, and, the indirect method have given possibility it with the branches. The water agar base way has promote a bigger mycelial growth, and the leaf extract base way improve a bigger colony proportion. The ACO way has promote the toxin expansion in all *Petri* dish and has have a bigger quantity of cercosporin for mycelial disc. All the way, except the A-A, has induced a cercosporin produce. The coconut milk base way and the leaf extract with and without gelling present the biggest cercosporina production. The isolated grown in the A-A way has produced quantities of cercosporin equal the isolated grown in the LCO and P-A ways with gelling. The toxin concentrations 40% and 50% showed better the cercosporin symptoms. The UFPB 131, UFPB 132, and UFPB 358 has showed tolerance to the cercosporin toxin.

**Keywords:** *Capsicum annuum*; *Cercospora capsici*; evaluation of genotypes

## LISTAS DE TABELAS

TABELA 1 ARTIGO 1	Análises de variância, para: Incidência de plantas com manchas nas folhas e nos ramos (IPMFR); Incidência de Plantas manchas nas folhas (IPMF) e Incidência de plantas sadias (IPS). UFPB/CCA, Areia, PB 2011.....	13
TABELA 2 ARTIGO 1	Média das variáveis para Incidência de plantas com manchas nas folhas e nos ramos (IPMFR); Incidência de Plantas com manchas nas folhas (IPMF) e Incidência de plantas sadias (IPS). UFPB/CCA, Areia, PB 2011. ....	14
TABELA 1 ARTIGO 2	Componentes dos meios de cultura utilizados para induzir o crescimento micelial e produção de cercosporina de <i>Cercospora capsici</i> isolado de cultivos de pimentas ornamentais no município de Areia-PB. Areia-PB, UFPB/CCA, 2014. ....	29
TABELA 2 ARTIGO 2	Análises de variâncias do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM); da área total média da colônia aos 60 dias após repicagem (ATMC); da área total da coloração vermelha produzida pelos micélios (ATCVM) e da quantidade de proteínas por disco micelial (QTPDM). Areia-PB, UFPB/CCA, 2014. ....	34
TABELA 3 ARTIGO 2	Média do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM); da área total média da colônia aos 60 dias após repicagem (ATMC) e da área total da coloração vermelha produzida pelos micélios (ATCVM) e da quantidade de proteína por disco micelial (QTPM). Areia-PB, UFPB/CCA, 2014. ....	35
TABELA 1 ARTIGO 3	Análises de variância da quantidade de toxina cercosporina extraídas do fungo <i>Cercospora capsici</i> cultivado em meios a base de água e leite de coco, suco V8, pimenta e água, com e sem geleificante. Areia-PB, UFPB/CCA, 2014. ....	47
TABELA 2 ARTIGO 3	Valores médios da quantidade de toxina cercosporina extraída do fungo <i>Cercospora capsici</i> cultivado em meios a base de água e leite de coco, suco V8, pimenta e água, com e sem geleificante. Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.....	48
TABELA 3 ARTIGO 3	Análises de variância da Incidência de folhas de pimenteiros lesionadas por diferentes concentrações da toxina cercosporina (IFLDC) e da seleção de genótipos quanto a ação da toxina cercosporina (SGATC). Areia-PB, UFPB/CCA, 2014. ....	48
TABELA 4 ARTIGO 3	Valores médios da Incidência de folhas de pimenteiros lesionadas por diferentes concentrações da toxina cercosporina (IFLDC) e da Seleção de genótipos quanto a ação da concentração de 50% da toxina cercosporina (SGACT). Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.....	50

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ARTIGO 1	Sintomas de <i>Cercospora</i> sp. em plantas de pimenteiras ( <i>Capsicum</i> spp.). A. Planta severamente atacada com setas indicando fruto lesionado (Fl) e um ramo lesionado (Rl). Escala= 2 cm. B. Folha apresentando lesões com diferentes tamanhos com seta indicando uma lesão foliar (LFl). Escala= 1cm. C. A seta indica lesão no pedúnculo do fruto (LPf). Escala 1 cm. Areia, PB, UFPB/CCA, 2011.....	15
FIGURA 2 ARTIGO 1	Estruturas fúngicas em amostras de folhas, caules e pedúnculos e meios de culturas. A. Tecido lesionado de ramo de pimenteira com seta indicando frutificações fúngicas (Ft). Escala=1µm. B. As setas indicam esporodóquio (Ep) com talos de conidióforos (Con) com conídios grandes e pequenos (C) na sua ponta rodeada de conídios. Escala= 1µm. C. Conidióforos de coloração marrom septado obtido de meio de cultura. Escala= 1µm. D. As setas indicam conídios septados (CS) e lisos (CL). Escala=1µm. E. Conídio Septado obtido de meio de cultura. Escala= 1µm; F. Conídios lisos (CL) e curvos (CC). Escala= 1µm. Areia, PB, UFPB/CCA, 2011. ....	17
FIGURA 3 ARTIGO 1	As setas indicam colônias fúngicas (CF) na face adaxial da folha de pimenteira. Escala=1µm. B. Crescimento e a colonização do fungo na face abaxial das folhas. Escala = 5µm C. Formação de frutificações nos estômatos (FE); D. Frutificações anfigenas (FA) de cor marrom na face abaxial das folhas destacadas de pimenteira Escala = 5µm. E. Fascículo de esporodóquio (FEs) com talos de conidióforos rodeados de conídios septados (CS). Escala= 1 µm. F. Conídios lisos. Escala= 1µm. Areia, PB, UFPB/CCA, 2011.....	19
FIGURA 1 ARTIGO 2	Fotomicrografias das colônias após 60 dias da inoculação. A. meio Leite de Coco-LCO. Escala 1 cm. B Pimenta ágar. Escala= 1 cm. C. Água de Coco Escala= 1 cm. D. Ágar-água. Escala= 1 cm. E. Suco de Tomate V8-A. Escala= 1 cm. Areia-PB, UFPB/CCA, 2014. ....	32
FIGURA 2 ARTIGO 2	Fotomicrografias das colônias aos 4 dias e aos 20 dias de crescimento: A. Meio Leite coco, seta indica o anel vermelho, produzido pelos micélios, característico de produção de cercosporina (PC). Escala= 1cm. B. Micélios repicados no início do crescimento, iniciando a formação do anel vermelho, característico de produção de cercosporina (PC) em meio LCO. Escala= 1 cm. C. Colônia em meio de cultura água de coco na sétima leitura de crescimento micelial, iniciando a produção de cercosporina (PC). Escala= 1 cm. D. Colônia em meio de cultura Suco V8 na sétima leitura de crescimento micelial, com seta indicando a produção de cercosporina em cima da colônia. Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.....	33

FIGURA 1

ARTIGO 3

Sintomas de queimas provocadas por cercosporina em folha de pimenteira. A. Folha com lesões provocada pela toxina cercosporina (LC). Escala= 1mm. B Detalhe de lesões da toxina cercosporina (LC) na folha inoculada. Escala= 1mm..... 51

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>3</b>
<b>3. DIAGNOSE E CARACTERIZAÇÃO DE CERCOSPORIOSE EM PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS CULTIVADAS EM AMBIENTE PROTEGIDO.....</b>	<b>6</b>
<b>3 1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>3 2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3 2 1. Avaliação dos genótipos de pimenteiros cultivados em cada de vegetação com infestação natural de cercosporiose .....</b>	<b>9</b>
<b>3 2 2. Diagnose e caracterização morfológica do fungo .....</b>	<b>10</b>
<b>3 2 3. Postulado de Koch.....</b>	<b>12</b>
<b>3 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>3 4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>20</b>
<b>3 5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>20</b>
<b>4. CULTIVO DE <i>Cercospora capsici</i> E PRODUÇÃO DE CERCOSPORINA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA .....</b>	<b>24</b>
<b>4 1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>4 2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4 2 1. Obtenção do fungo .....</b>	<b>28</b>
<b>4 2 2. Extração e quantificação da cercosporina .....</b>	<b>30</b>
<b>4 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>4 4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>36</b>
<b>4 5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>
<b>5. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CERCOSPORINA E INOCULAÇÃO EM GENÓTIPOS DE PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS .....</b>	<b>40</b>
<b>5 1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>5 2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>5 2 1. Cultivo do fungo e extração de proteína .....</b>	<b>43</b>

<b>5 2 2. Inoculação de proteínas totais de cercosporina em plantas de pimenteiras ornamentais em condições de laboratório .....</b>	<b>45</b>
<b>5 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>5 4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>5 5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>55</b>





# 1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Solanaceae é composta pelo gênero *Capsicum*, que têm origem americana, com exceção da espécie *Capsicum anomalum* Franch. & Sav. que tem origem asiática (SILVA, 2002). Este gênero apresenta ampla variabilidade de caracteres morfoagronômicos, químicas e moleculares. O gênero é composto de 33 espécies, incluindo as silvestres, semidomesticadas e domesticadas. As domesticadas são divididas em cinco: *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. e *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav (REIFSCHNEIDER, 2000 e PIKERGILL, 1997):

O consumo de pimentas ocorre na forma processada e *in natura*. Na indústria seu uso ocorre em diversas áreas entre elas: farmacêuticas, alimentícias e cosméticas, além de serem comercializadas como ornamentais (PINTO et al., 2007).

No Brasil o cultivo de pimenteiras, em sua maior parte, é proveniente da agricultura familiar e a sua produção está ligada à agroindústria. Essa integração contribui para o desenvolvimento e aumento da renda dos produtores familiares e ao mesmo tempo a fixação dos trabalhadores rurais no campo (YAMAMOTO e NAWATA, 2005; BENTO et al., 2007).

Os principais estados produtores de pimentas do País são: Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Ceará, Bahia e Pará (RUFINO e PENTEADO, 2006; REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2008).

Na Paraíba o cultivo dessa hortaliça é realizado pela agricultura familiar (RÊGO et al., 2011 e 2012) e sua produção está dividida em pimenteiras de mesa integrada a agroindústria e ornamentais. O cultivo de pimenta de mesa utiliza sementes de cultivares não adaptadas ao clima da região (PARAÍBA, 2008; 2012). Já o cultivo das ornamentais utiliza cultivares desenvolvidos para a região, porém, com suscetibilidade a diferentes patógenos, isso devido, ao programa de melhoramento visar apenas características ornamentais (RÊGO et al., 2011 e 2012).

A falta de cultivares adaptados aos estresses bióticos gera grandes problemas para o cultivo de *Capsicum*, uma vez que as espécies pertencentes a este gênero são afetadas por diferentes agentes biológicos que causam doenças gerando grandes prejuízos à produção e ao seu beneficiamento (LOPES et al., 2011).

A cercosporiose, por exemplo, promove intensa redução da área foliar das pimenteiras, comprometendo o seu processo fotossintético e, dependendo da intensidade da doença, pode infectar caule, ramos e pedúnculo dos frutos (MATSUOKA et al., 1996; NICOLI et al., 2011

e PHENGSIINTHAM et al., 2013) o que leva a perdas econômicas significativas nos seus cultivos em vários países do mundo, principalmente em regiões com temperaturas acima de 25°C e umidade relativa acima de 90% (MEON, 1990; JUN et al., 2009; SWAMY et al., 2012).

Os sintomas iniciais da doença nas folhas são de lesões aquosas, translúcidas de cor verde-escura, que quando evoluem ficam branco-acinzentadas, de formato circular, rodeada por anéis concêntricos, com bordos escuros e centro acinzentado, coalescendo e formando grandes áreas necróticas que caem das plantas ocasionando a desfolha prematura, expondo os frutos à luz intensa do sol e ao ataque de outros organismos secundários (MATSUOKA et al., 1996 e MONTEIRO et al., 2000). Nos caules, ramos e pedúnculos dos frutos, os sintomas caracterizam-se por lesões maiores alongadas de coloração acinzentada com bordos escuros (SENDÍN e BARRIOS, 1984).

A cercosporiose é causada por fungos do gênero *Cercospora* que é considerado um dos maiores gêneros hifomicetos (CROUS e BRAUN, 2004). Espécies desse gênero apresentam crescimento lento e escassez de esporulação em meios artificiais (DEL PELOSO et al., 1989), e produzem um metabólito secundário de origem policetídeo, pertencendo ao grupo químico das perilenoquinonas de coloração vermelha chamada de toxina cercosporina (ASSANTE et al. 1977; FAJOLA, 1978 e BATCHVAROVA et al., 1992).

Em presença de luz a cercosporina torna-se excitada adquirindo capacidade de interagir e danificar macromoléculas (DAUB e BRIGGS, 1983), sendo considerada essencial para o sucesso da patogênese de seus hospedeiros, pois desempenha um papel importante na expressão da doença. Segundo Daub e Chung (2007), essa toxina é um fator de virulência, que aumenta significativamente a quantidade e gravidade da doença.

O emprego de toxinas fúngicas na seleção de genótipos resistentes a doenças é uma boa opção quando se trabalha com fungos que apresentam dificuldades de esporulação e crescimento lento *in vitro*, como é o caso das cercosporas (SILVA et al., 1988; DEL PELOSO et al., 1989; QUEIROZ e MENEZES, 1993; RIBEIRO et al., 1997; ROSA e MENEZES, 2000; ÁVILA e PITELLI, 2004; SWAMY et al., 2012). Estes fatores: pouca esporulação e crescimento lento tornam-se um empecilho para o isolamento, purificação da colônia e inoculação dos fungos nas plantas.

Pesquisas sobre a caracterização e crescimento de cercospora de *Capsicum* e indução, detecção e quantificação de cercosporina em cercospora de *capsicum* spp. em diferentes meios de cultura são poucas. Sendo assim, os trabalhos objetivaram identificar e caracterizar

morfologicamente o fungo causador da cercosporiose em espécies de *Capsicum* do Banco Ativo de Pimenteira da Universidade Federal da Paraíba; induzir, detectar e quantificar a cercosporina em fungos de cercosporiose de pimenteira cultivada em diferentes meios de cultura e avaliar genótipos de pimenteiras quanto ao comportamento à ação da cercosporina.

## 2 REFERÊNCIAS

- ASSANTE, G.; LOCCI, R.; CAMARDA, L.; MERLINI L.; NASINI, G. Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. **Phytochemistry**, Milano, USA, v. 16, p. 243-347. 1977.
- BATCHVAROVA, R.B.; REDDY, V.S.; BENNETT, J. Cellular resistance in rice to cercosporin, a toxin of *Cercospora*. **Phytopathology**, Oxford, Inglaterra, v. 82, n. 6, p. 642-646. 1992.
- BENTO, C.S.; SUDRE, C. P.; RODRIGUES, C.; RIVA, R. M.; PEREIRA, E.M.G. Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre genótipos de pimentas. **Scientia Agraria**, Curitiba, Brasil, v.8, n.2, p. 149-156. 2007.
- CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. De B.; BUSTAMANTE, P. G.; SILVA, D. B. Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**, 49 p. 2003.
- CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; PONGPANICH, K.; HIMAMAN, W.; ARZANLOU, M.; WINGFIELD, M.J. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian *Acacia* species grown as exotics in the tropics. **Studies in Mycology**, Utrecht, Província Países Baixos, v.50, p.457-469. 2004.
- DAUB, M.E.; BRIGGS, S.P. As alterações na composição da membrana celular do tabaco e da estrutura causadas pela toxina fúngica, cercosporina. **Plant Physiology**, Glasgow, Reino Unido, v.7, p.763-766. 1983.
- DAUB, M.E.; CHUNG, K.R. Cercosporin: A Phytoactivated Toxin in **Plant Disease Journal**, Saint Paul, USA. Online. APSnet. 2007.
- DEL PELOSO, M.J.; CARDOSO, A.A.; VIEIRA, C.; SARAIVA, L.S. AND ZIMMERMANN, M.J. DE O. Genetic system for the reaction of *Phaseolus vulgaris* to the BA-2 (alpha) race of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Revista Brasileira de Genética**. Ribeirão Preto, Brasil, v.12, p.313-318. 1989.
- FAJOLA, A.O. Cercosporin, a phytotoxina from *Cercospora* spp. **Physiological Plant Pathology**. Maryland, EUA, v.13, p. 157-164. 1978.
- JUN, S.; ZHI-HENG, L.; HONG, Y.; SHA, L.; CONG, T. Sensitivity of *Cercospora capsici* Heald. et Wolf. to nine fungicides. **Chinese Journal of Tropical Crop**, Hainan, China, v. 12, p. 1. 2009.

LOPES, C.A.; HENZ, G.P.; REIS, A. Doenças das Pimenteiras e seus controles. In: RÊGO, E.R.; FINGER, F.L.; RÊGO, M.M. **Produção, Genética e Melhoramento de Pimenteiras (*Capsicum* spp.)**. Recife: Imprima. p. 53-69. 2011.

MATSUOKA, K.; VANETTI, C.A.; COSTA, H.; PINTO, C.M.F. Doenças causadas por fungos em pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.184, p.64-66. 1996.

MEON, S.. Infection of chilli by *Cercospora capsici*. **Pertanika Journal of Science & Technology**, Selangor, Malásia, v. 13, n. 3, p. 321-325.1990.

MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. **Doenças causadas por fungos e bactérias em pimentão e pimenta**. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. Controle de doenças de plantas: hortaliças. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v.2, p.637-675. 2000.

NICOLI, A., ZAMBOLIM, L., NASU, E.G.C., PINHO, D.B., PEREIRA, O.L., CABRAL, P.G.C., ZAMBOLIM, E.M. First report of *Cercospora apii* leaf spot on *Capsicum chinense* in Brazil. **Plant Disease Journal**, USA, v. 95, n.9 p.1194.2011.

PARAÍBA (Estado) Instituto de Desenvolvimento Municipal e Estadual – IDEME. Agricultores vão receber incentivos fiscais para a instalação de indústrias. 2009. Disponível em: <<http://www.paraiba.pb.gov.br/17108/agricultores-vao-receber-incentivos-fiscais-para-a-instalacao-de-industrias.html?theme=active>> Acesso em: 17 de janeiro de 2015.

PARAÍBA (Estado) Instituto de Desenvolvimento Municipal e Estadual – IDEME. Agricultora familiar garante renda na produção de pimenta orgânica. 2012. Disponível em: <<http://www.paraiba.pb.gov.br/51379/agricultora-familiar-garante-renda-na-producao-de-pimenta-organica.html>> Acesso em: 17 de janeiro de 2015.

PHENGSTHAM P, BRAUN U, MCKENZIE EHC, CHUKEATIROTE E, CAI L, HYDE KD. Monograph of cercosporoid fungi from Thailand. **Plant Pathology & Quarantine**, Chiang Rai, Tailândia, v.3: p. 19–90. 2013.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v. 96, n. 1, p. 129-133. 1997.

PINTO CMF; CALIMAN FRB; MOREIRA GR; MATTOS RN; ROCHA PRR; VENZON M; PAULA JÚNIOR TJ. **Pimenta (*Capsicum* spp.)**. In: PAULA JÚNIOR TJ; VENZON M. (coord). *Culturas: manual de tecnologias agrícolas*. Belo Horizonte: EPAMIG. p. 625-632. 2007.

RÊGO, E.R.; FINGER, L.F.; NASCIMENTO, M.F.; BARBOSA, L.A.; SANTOS, R.M.C. **Pimenteiras Ornamentais**. In: RÊGO, E.R.; FINGER, L.F.; RÊGO, M.M. Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum* spp.). Areia, Universidade Federal da Paraíba. 223p. 2011.

RÊGO, E.R.; SANTOS, R.M.C.; RÊGO, M.M.; NASCIMENTO, M.F.; NASCIMENTO, N.F.F.; SILVA, A.M. **Produção de mudas e disponibilização de cultivares de pimenteiras:**

**sustentabilidade, inclusão social e geração de trabalho e renda nas comunidades de Macacos e Furnas no brejo paraibano.** In: MIRANDA V.C.M., SOBRINHO RGS & RÊGO ER (Eds.) Sustentabilidade, Inclusão Social e Geração de Trabalho e Renda - Perspectivas de Extensão Universitária. Areia, Universidade Federal da Paraíba. p.11-30. 2012.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO, C. S.C. Cultivo. In: RIBEIRO, C.S.C.; LOPES, C.A.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum*. Brasília:** Atlhalaia Gráfica e Editora Ltda, p. 11-14. 2008.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. *Capsicum* Pimentas e Pimentões do Brasil. *Brasília:* Embrapa comunicação para transferência de tecnologia/ **Embrapa Hortaliças**, 113 p. 2000.

RUFINO, J. L; PENTEADO, D. C. S. Cultivo da pimenta: Importância econômica, perspectiva e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n 235, p.7-15. 2006.

SENDÍN, M.A.P.; BARRIOS, J.G. Incidência de *Cercospora capsici* en zonas de producción de pimiento (*Capsicum annuum*) em Cuba. **Ciencias de La Agricultura**, Habana, Cuba, v.21, p.19-24. 1984.

SILVA, A. C. T. F.; LEITE, I. C.; BRAZ, L. T. Viability evaluation of pollen as possible indicator of high temperature tolerance in tomato genotypes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Capinas, Brasil, v.12, n°.2, p.156-165. 2002

SWAMY, K. M.; NAIK, M.K.; PATIL, S.; AMARESH, Y.S. Growth of *Cercospora capsici* on different solid and liquid media. **Journal of Mycopathological Research**, Kolkata, India, v. 50, n.2, p. 313-316. 2012.

YAMAMOTO, S.; NAWATA, E. *Capsicum frutescens* L. in Southeast and East Asia, and its dispersal routes into Japan. **Economic Botany**. Western Cape, África do Sul, v. 59, p. 18-28. 2005.

### **3 DIAGNOSE E CARACTERIZAÇÃO DE CERCOSPORIOSE EM PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS CULTIVADAS EM AMBIENTE PROTEGIDO**

Aline da Silva Santos; Mailson Monteiro do Rêgo; Elizanilda Ramalho do Rêgo; Lucas Chaves Cavalcante

#### **RESUMO**

As pimenteiras ornamentais são acometidas por diferentes agentes biológicos que causam doenças gerando prejuízos como a cercosporiose. Assim, o objetivo do trabalho foi realizar a diagnose e caracterização morfológica da doença em pimenteiras cultivadas em casa de vegetação no município de Areia, PB. Para isso, foi avaliada a incidência da doença em seis genótipos de pimenteiras. Procedeu-se o isolamento do fungo por meio dos métodos direto e indireto. Foi realizada a caracterização e identificação do fungo com auxílio de microscópio óptico e a confirmação da patogênese pelo postulado de Koch. Nas folhas inoculadas, observaram-se sintomas característicos de cercosporiose. A reação dos genótipos quanto à incidência de *Cercospora* foi diferenciada, indicando variabilidade para esse caráter. Os métodos de isolamento foram eficientes, dependendo do órgão da planta utilizado. O uso do método direto possibilitou o isolamento do fungo em todas as partes vegetais utilizadas, enquanto que o método indireto foi mais eficiente em ramos. As estruturas fúngicas visualizadas ao microscópio óptico foram semelhantes às descritas para o fungo *Cercospora capsici*, sendo este confirmado como causador de cercosporiose através do postulado de Koch.

**Palavras-chave:** *Cercospora* sp.; *Capsicum* spp.; doença.

## ABSTRACT

### DIAGNOSIS AND CERCOSPORA LEAF SPOT CHARACTERIZATION IN ORNAMENTAL CHILI CULTURED ENVIRONMENT PROTECTED

The ornamental chili plants are affected by different biological agents which causes diseases and it gives loss such as Cercospora leaf spot. Thus, the aim of this work was to realize a diagnosis and a morphological characterization of this disease in chili plants grown in greenhouse located at the Areia town, PB. For this, it was tested the incidence of this disease in six chili genotypes. First we did the fungi isolation thus the direct and indirect method. Second, it was realized a characterization and an identification of the fungi with the help of the optic microscope and the confirmation of the pathogenesis with the Koch postulate. In the inoculated leaves, it was possible to see symptoms of Cercospora leaf spot. The apartness method was effective, in each part of the vegetable used. The direct method was efficient in all parts of the infected parts of the plant used, the indirect method was more effective in the branches. The fungi structures that was seen with the optic microscope are similar to the *Cercospora capsici* fungi, that causes the Cercospora leaf spot the Koch postulate.

**Keywords:** *Cercospora* sp.; *Capsicum* spp.; disease.

### 3.1 INTRODUÇÃO

As pimenteiras do gênero *Capsicum* são cultivadas em todo o mundo e utilizadas como tempero nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética, e como plantas ornamentais. Estas espécies são consumidas *in natura* e podem ser utilizadas em diversos produtos alimentícios (PINTO et al., 2007). Outro fato a ser salientado é a importância socioeconômica, pois o cultivo de pimentas e pimentões contribui para o aumento da renda da agricultura familiar e para a fixação de trabalhadores na área rural (YAMAMOTO e NAWATA, 2005; BENTO et al., 2007).

A área cultivada com pimenteiras em 2007 no Brasil ficou estimada em aproximadamente 1,9 mil ha, segundo a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas-ABCSEM (2011). Sendo as regiões Centro-Oeste e Sudeste as principais produtoras, com destaque para os estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo, seguidos dos estados do Ceará e Bahia, na região Nordeste, e Pará, na região Norte do país (RUFINO e PENTEADO, 2006; REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2008).

Na Paraíba, o cultivo de pimenteiras é realizado, em sua maioria, pela agricultura familiar integrada com a agroindústria, uma vez que os produtos dos cultivos dessas olerícolas nos municípios de Alagoa Grande, Quixaba, São João do Cariri, são praticados em quintais e pequenas áreas dos agricultores familiares e os produtos são vendidos nas formas *in natura* e industrializados artesanalmente (PARAÍBA, 2009, 2012).

Em Areia, PB, no Brejo paraibano, a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) vem desenvolvendo o Programa de Melhoramento de Pimenteiras Ornamentais com o objetivo de avaliar e selecionar linhagens para aproveitar o vigor híbrido na geração F<sub>1</sub>, para assim, fazer avaliação e seleção das melhores combinações híbridas com potencial ornamental, visando disponibilizá-las aos agricultores familiares da região, como as comunidades de Macacos e Furnas que passaram a cultivar pimenteiras ornamentais em estufas (RÊGO et al., 2011 e 2012).

Os produtores de pimentas de mesa da Paraíba utilizam sementes de cultivares não adaptadas ao clima da região (PARAÍBA, 2011; 2012). No entanto, as cultivares de pimenteiras ornamentais cultivadas neste estado foram produzidas para a região, porém, apresentam suscetibilidade a diferentes patógenos devido ao melhoramento empregado visar apenas características ornamentais (RÊGO et al., 2011 e 2012). A falta de cultivares com adaptação aos estresses bióticos gera grandes problemas para o cultivo de pimenteiras e pimentões. As espécies de *Capsicum* são infestadas por diferentes agentes biológicos,



bactérias, vírus, nematóides e fungos, que causam doenças gerando grandes prejuízos à produção e ao beneficiamento de pimenteiras (LOPES et al., 2011).

Entre as principais doenças que acometem pimenteiras e pimentões tem-se a cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora capsici* Heald & Wolf, que se manifesta em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais, com temperaturas entre 18 a 25 °C e umidade relativa acima de 90%. Nos últimos anos, foi relatada a presença de outras espécies de *Cercospora* infectando algumas espécies de *Capsicum*: *Cercospora apii* Fresen isolado de *Capsicum chinense* Jacq., em Minas Gerais (NICOLI et al., 2011); o *Cercospora capsicigena* Bhartiya, R. Dubey & S.K. Singh encontrado na Índia, Utar Pradexe, Laos e Tailândia (BHARTIYA et al., 2000 e PHENGSTHAM et al., 2013).

Os fungos causadores dessa doença promovem intensa redução da área foliar, comprometendo o processo de fotossíntese das plantas e, dependendo da intensidade da infestação, pode infectar ramos, pedúnculo e frutos (MATSUOKA et al., 1996; MATSUOKA et al., 1996; NICOLI et al., 2011; BHARTIYA et al., 2000), resultando em perdas econômicas significativas em cultivos de pimenteiras do gênero *Capsicum* em vários países do mundo (MEON, 1990; JUN et al., 2009; SWAMY et al., 2012). Dessa forma, a diagnose correta poderá fornecer elementos necessários para a escolha dos métodos de manejo da doença, mais adequado para o seu controle, juntamente com o conhecimento da epidemiologia do fitopatógeno (AMORIM et al., 1995).

No Brasil, existem relatos de cercosporiose em pimenteiras nos estados do Ceará, Espírito Santos, Minas Gerais, Pernambuco, São Paulo e Goiás (LOCH et al., 1975; MICHEREFF et al., 2006; AGROLINK, 2010; SILVA, 2010; MICHEREFF et al., 2011), não havendo relato desta doença em pimenteiras e pimentões na Paraíba. O presente trabalho teve por objetivo realizar a diagnose, identificar qual o método de isolamento e a parte da planta mais eficiente para obtenção do fungo e a caracterização da cercosporiose em pimenteiras cultivadas em ambiente protegido visando subsidiar informações para o controle eficiente desta doença.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Avaliação dos genótipos de pimenteiras cultivadas em casa de vegetação com infestação natural de cercosporiose**

O trabalho foi realizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB/CCA), Campus II, Areia-PB, (Lat. - 6° 58"; Long. 35° 41"; Alt. 574 m).

O município de Areia fica localizado a 117 km da capital, João Pessoa, integrado à Microrregião Geográfica do Brejo Paraibano, com temperatura média anual de 24,0°C; umidade relativa média em torno de 80% e precipitação média anual de 1400 mm. O clima foi classificado por KÖPPEN (1936), como As<sup>''</sup>, tropical, semiúmido, com chuvas no período outono-inverno e por Thornthwaite (1948), como B1 Ra „a<sup>''</sup>, úmido, com pouca deficiência de umidade, megatérmico, com pequena variação de temperatura.

A temperatura média obtida durante o desenvolvimento do trabalho foi de 22°C, apresentando umidade relativa de 83% e precipitação 152 mm, sendo que nos meses de julho a agosto – meses de obtenção das avaliações – as condições climáticas foram: temperatura de 20,2 e 20,4; umidade relativa 91% e 86% e precipitação 363 e 156,9 mm. Estes dados foram coletados na Estação Meteorológica do CCA/UFPB.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições compostas de quatro plantas cada uma delas. Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para análise dos dados foi utilizado o programa Genes (CRUZ, 2013).

Foram selecionadas 16 plantas de seis genótipos de pimenteiras ornamentais, UFPB 134, UFPB 137, UFPB 346, UFPB 348, UFPB 349 e UFPB 355 do Banco Ativo de Pimenteiras do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB/CCA), Campus II, Areia-PB, em estágio vegetativo, cultivados em casa de vegetação, apresentando plantas com e sem sintomas de infestação natural de cercosporiose, aleatoriamente, totalizando 96 plantas.

As variáveis analisadas foram incidência de plantas com manchas nas folhas e nos ramos; plantas infectadas com manchas nas folhas e plantas sadias. Para obtenção das porcentagens das incidências, foi utilizada a fórmula de Porcentagem de incidência de plantas doente, descrita por Bhat et al. (2008) adaptada:  $PIPD = (NPD/NTPO) \times 100$ , onde PIPD = Porcentagem de incidência de plantas manchas nas folhas e nos ramos ou manchas nas folhas ou plantas sadias; NPD = Número de plantas manchas nas folhas e nos ramos ou manchas nas folhas ou plantas sadias e NTPO = Número total de plantas observadas.

### **3.2.2 Diagnose e caracterização morfológica do fungo**

Amostras das partes aéreas sintomáticas de plantas de pimenteiras ornamentais que estavam sendo cultivadas em casa de vegetação em estádios vegetativos, florescimento e

frutificação foram coletadas e conduzidas ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal do mesmo centro para diagnose e caracterização morfológica do fungo.

Na casa de vegetação foram selecionadas aleatoriamente quatro plantas sintomáticas e, de cada planta coletou-se quatro amostras: quatro folhas, quatro ramos e quatro pedúnculos de frutos.

Inicialmente, as amostras foram lavadas com água e detergente neutro e, posteriormente, desinfestadas superficialmente com álcool a 70% por um minuto, hipoclorito de sódio a 30% por dois minutos e enxaguadas em água destilada esterilizada (ADE) duas vezes durante um minuto (ALFENAS, 2007).

Foram utilizados dois métodos de isolamento: o direto e o indireto (ALFENAS e MAFIA, 2007). No isolamento direto, foi utilizada a metodologia descrita por Meon (1990), e após a desinfestação, as amostras de folhas, ramos e pedúnculos contendo uma lesão com diâmetro entre 3-4 mm foram cortadas em pequenos pedaços de 0,5 cm e incubados em câmara úmida por 24 horas dentro de estufas incubadoras para BOD (*Biochemical Demand for Oxygen* - Demanda Bioquímica de Oxigênio) ELETROLab EL 202 a  $20 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 12 horas.

A identificação do fungo foi realizada através da preparação de lâminas de vidro com corante carmim e água (v/v) (MENEZES e ASSIS, 2004); visualização das estruturas fúngicas ao microscópio óptico; utilização de chaves de identificação de fungos existentes na literatura (BARNETT e HUNTER, 1998) e publicações específicas sobre a cercosporiose em pimenteiras e pimentões (WELLES, 1923; CHUPP, 1953; MEON, 1990).

Após a identificação do fungo, com auxílio de uma lupa binocular Euromex Novex Ar Bino e de uma lâmina de bisturi, foi realizada a transferência das estruturas fúngicas presentes nas folhas, caules e pedúnculo para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA), 500 mL de extrato obtido de 200g batata, 20g de dextrose 17g de ágar, completando o volume para um litro com água destilada. As placas foram mantidas sob incubação em BOD a  $20 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 12 horas por dez dias.

Passado o tempo de incubação, foram feitas sucessivas repicagens das colônias com características do gênero *Cercospora* para a purificação em meio de cultura V8-A, 200 mL de suco V8 “Campbell”, 17 g de ágar, completando o volume para um litro com água destilada.

O isolamento indireto seguiu a metodologia descrita por Meon (1990) com modificações.

As amostras desinfestadas de folhas, ramos e pedúnculos contendo uma lesão com diâmetro entre 3-4 mm foram cortadas em pequenos pedaços de 0,5 cm e transferidas para

placas de Petri contendo meio BDA. Estas foram incubadas por cinco dias a temperatura de  $20 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 12 horas dentro de BOD. Após o período de incubação, foram realizadas 25 repicagens das colônias com características do gênero *Cercospora* para a purificação em meio de cultura V8-A.

Cada método de isolamento foi realizado quatro vezes observando as estruturas fúngicas presentes nas partes da planta utilizadas nos isolamentos, através da preparação de lâminas e visualização em microscópio óptico, avaliando as metodologias e as partes das plantas mais eficientes para isolamento da *Cercospora*.

### **2.3 Postulado de Koch**

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, constituído por uma placa com três folhas, as quais foram mantidas em câmara úmida por 72 horas. Das folhas que apresentaram manchas ou estruturas fúngicas foram feitas lâminas para visualização ao microscópio óptico. Os dados foram analisados utilizando as análises descritivas.

Para confirmação do postulado de Koch foi selecionada de forma aleatória uma colônia fúngica pura dos isolados obtidos dos dois métodos de isolamento para inoculação de folhas sadias destacadas de pimenteiras.

As folhas foram desinfestadas em álcool 70% e hipoclorito 30%, inoculadas e colocadas em câmara úmida por 72 horas dentro de BOD a  $20 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 12 horas devido às folhas não suportarem maior tempo de incubação.

Na face superior da folha foi feito um orifício com auxílio de uma seringa ultrafina para inoculação, onde foi colocado 5 µL de solução do Inóculo na concentração de  $2 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup> de conídios, contendo espalhante adesivo, Tween 80 a 1%.

Os conídios foram provenientes de colônias fúngicas dos isolamentos tanto do direto como do indireto, onde se fez raspagem da colônia com água e pincel seguido de filtração em gaze. Como tratamento controle foi inoculado 5 µL de ADE no orifício feito na face adaxial de folha de pimenteira.

### **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nas análises de variâncias foi observado efeito altamente significativo ( $P > 0,001$ ) em todas as variáveis analisadas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análises de variância, para: Incidência de plantas com manchas nas folhas e nos ramos (IPMFR); Incidência de Plantas manchas nas folhas (IPMF) e Incidência de plantas sadias (IPS). UFPB/CCA, Areia, PB 2011.

FV	GL	Quadrados Médios		
		IPMFR	IPMF	IPS
Genótipos	5	22,087**	14,633**	37,536**
Resíduo	18	3,489	3,264	0,989
Total	23			
CV(%)		37,716	36,752	17,715

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade. \*Significativo a 5% de probabilidade. <sup>3\*</sup> (FV) Fonte de Variação; (GL) Graus de Liberdade; (QM) Quadrados Médios e (CV) Coeficiente de Variação.

Os dados da Tabela 2 indicam que a doença, embora em proporções variáveis, esteve presente em todos os genótipos de pimenteiros cultivadas na casa de vegetação. A análise dos dados revelou que os genótipos UFPB 134; UFPB 346; UFPB 348 e UFPB 349 mostraram as maiores percentagens de plantas com manchas nas folhas e nos ramos, demonstrando severidade da doença (Tabela 2). No entanto, o genótipo UFPB 349 apresentou 100% de plantas infectadas com a doença. Ambientes favoráveis a esta doença provoca intensa redução da área foliar e lesões nos ramos, pedúnculos e frutos (MATSUOKA et al., 1996, NICOLI et al., 2011).

A alta severidade da cercosporiose observada durante a condução do experimento deveu-se também às condições climáticas favoráveis observadas nos meses de condução do experimento, que foram: 20,2 à 20,4; umidade relativa 91% à 86% e precipitação 363 à 156,9 mm, segundo a dados da Estação Meteorológica do CCA/UFPB.

O genótipo UFPB 137 foi o que exibiu a maior incidência de plantas sem sintomas da doença seguido dos genótipos UFPB 137 e UFPB 355 (Tabela 2), confirmando assim a existência de variabilidade e a presença de plantas com provável resistência a este patógeno dentro dos genótipos. Em milho foram identificados genótipos tolerantes e híbridos resistentes à infestação de *Cercospora zae-maydis* Tehon & Daniels (DONG et al., 2003, BRITO et al., 2008). Trabalhos de avaliação de germoplasma de pimenteira quanto a resistência à cercosporiose são raros ou inexistentes devido a dificuldade de crescimento e esporulação do fungo em substratos artificiais (NAGEL, 1934; DANTAS, 1948).

**Tabela 2.** Média das variáveis para Incidência de plantas com manchas nas folhas e nos ramos (IPMFR); Incidência de Plantas com manchas nas folhas (IPMF) e Incidência de plantas sadias (IPS). UFPB/CCA, Areia, PB 2011.

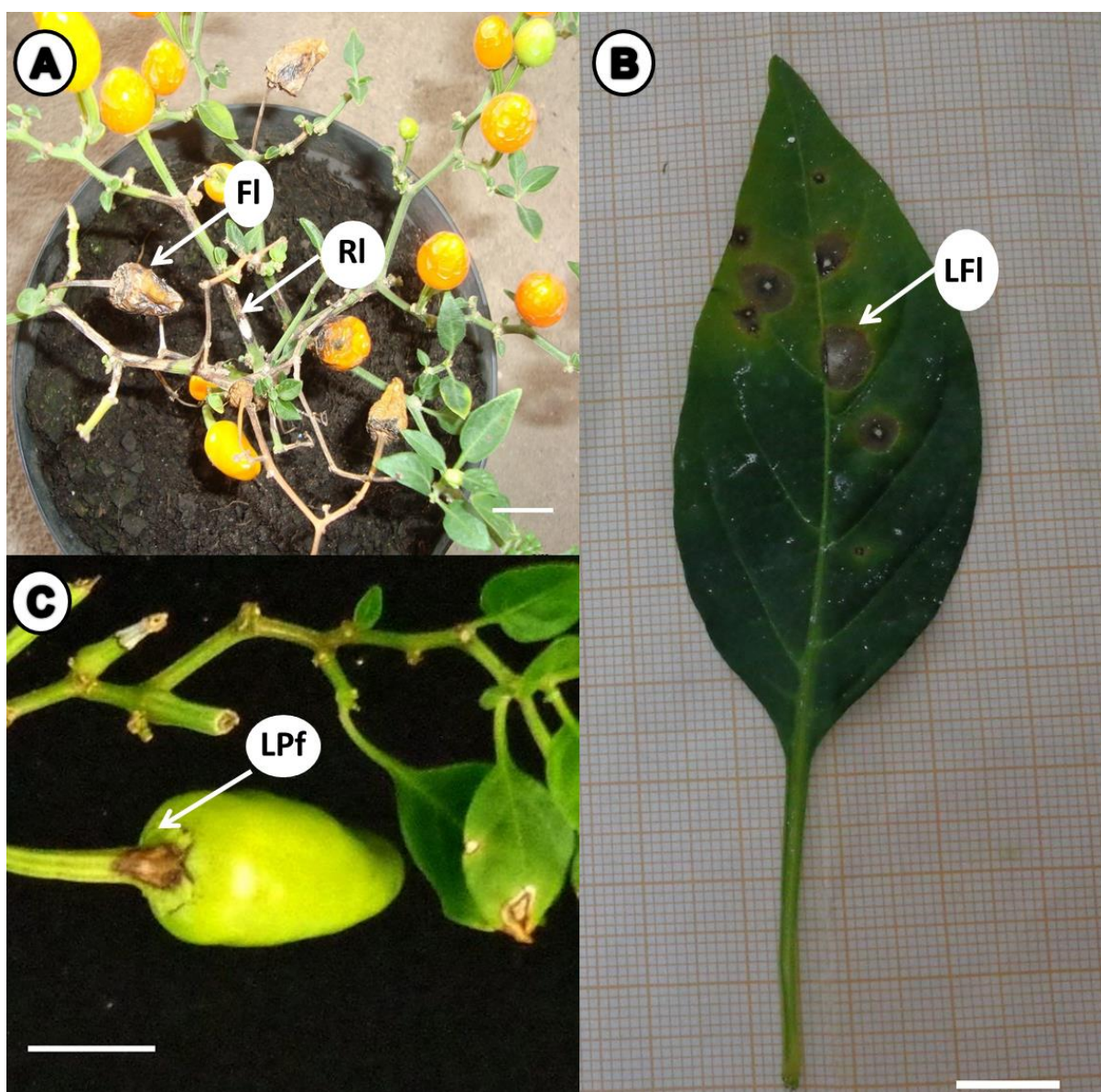
Genótipos	IPMFR	IPMF	IPS
UFPB 134	25,00a	25,00a	50,00b
UFPB 137	6,25b	6,25b	87,50a
UFPB 346	62,50a	18,75b	18,75c
UFPB 348	31,25a	43,75a	25,00c
UFPB 349	50,00a	50,00a	0,00d
UFPB 355	12,50b	31,25a	56,25b

\*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si.

Nas plantas cultivadas em casa de vegetação foram observadas pequenas lesões foliares branca-acinzentadas, de formato circular, rodeada por dois anéis concêntricos de coloração amarela e marrom escuro, respectivamente, com bordos escuros e centro cinza-claro, apresentando folhas com uma ou mais lesões de variados tamanhos que coalesciam formando grandes áreas necróticas (Figura 1B). Observaram-se também nos ramos, manchas necróticas alongadas branco-acinzentadas, que se estendiam provocando a sua seca (Figura 1A), e manchas escuras nos pedúnculos dos frutos (Figura 1C).

As plantas em estágio mais avançado da doença apresentavam desfolha acentuada, seca dos ramos, dos pedúnculos e dos frutos. (Figura 1A). Sintomas semelhantes foram mencionados também por Chupp (1953); Meon (1990); Monteiro et al. (2000); Lopes e Ávila (2003), Pinto et al. (2011) e Lopes et al. (2011), mas não houve menção de infecção nos ramos e nos pedúnculos. Matsuoka et al. (1996); Basak (1994) e Bhat et al. (2008) observaram a presença de cercospora em frutos apodrecido e pedúnculo.

Os sintomas relatados acima não corroboram com os sintomas causados pelos fungos *C. appi* que provocam pequenas lesões anfigenas, inicialmente circular ou elipsoide, esbranquiçadas com centro bronze e rodeada por um halo roxo-marrom ou avermelho escuro nas folhas, cálices, frutos e caules, que se aglutinavam formando grandes áreas necróticas (NICOLI et al., 2011) e *C. capsicigena* que gera manchas anfigenas, irregulares circulares coalescentes formando extensas lesões ao longo das folhas com centro branco acinzentado, com margens marrons (BHARTIYA et al., 2000)



**Figura 1.** Sintomas de *Cercospora* sp. em plantas de pimenteiras (*Capsicum* spp.). A. Planta severamente atacada com setas indicando fruto lesionado (FI) e um ramo lesionado (RI). Escala= 2 cm. B. Folha apresentando lesões com diferentes tamanhos com seta indicando uma lesão foliar (LFI). Escala= 1cm. C. A seta indica lesão no pedúnculo do fruto (LPf). Escala 1 cm. Areia, PB, UFPB/CCA, 2011.

Os métodos utilizados para isolamento do fungo mostraram-se eficientes dependendo do órgão da planta utilizado. Através do método direto foi possível isolar os fungos em todas as amostras utilizadas: folhas, ramos e pedúnculo. Em pelo menos uma placa repicada havia presença de colônia do fungo, corroborando com Loch et al. (1990) e Meon (1990) que conseguiram isolar o fungo *C. capsici* de folhas de pimentões pelo método direto.

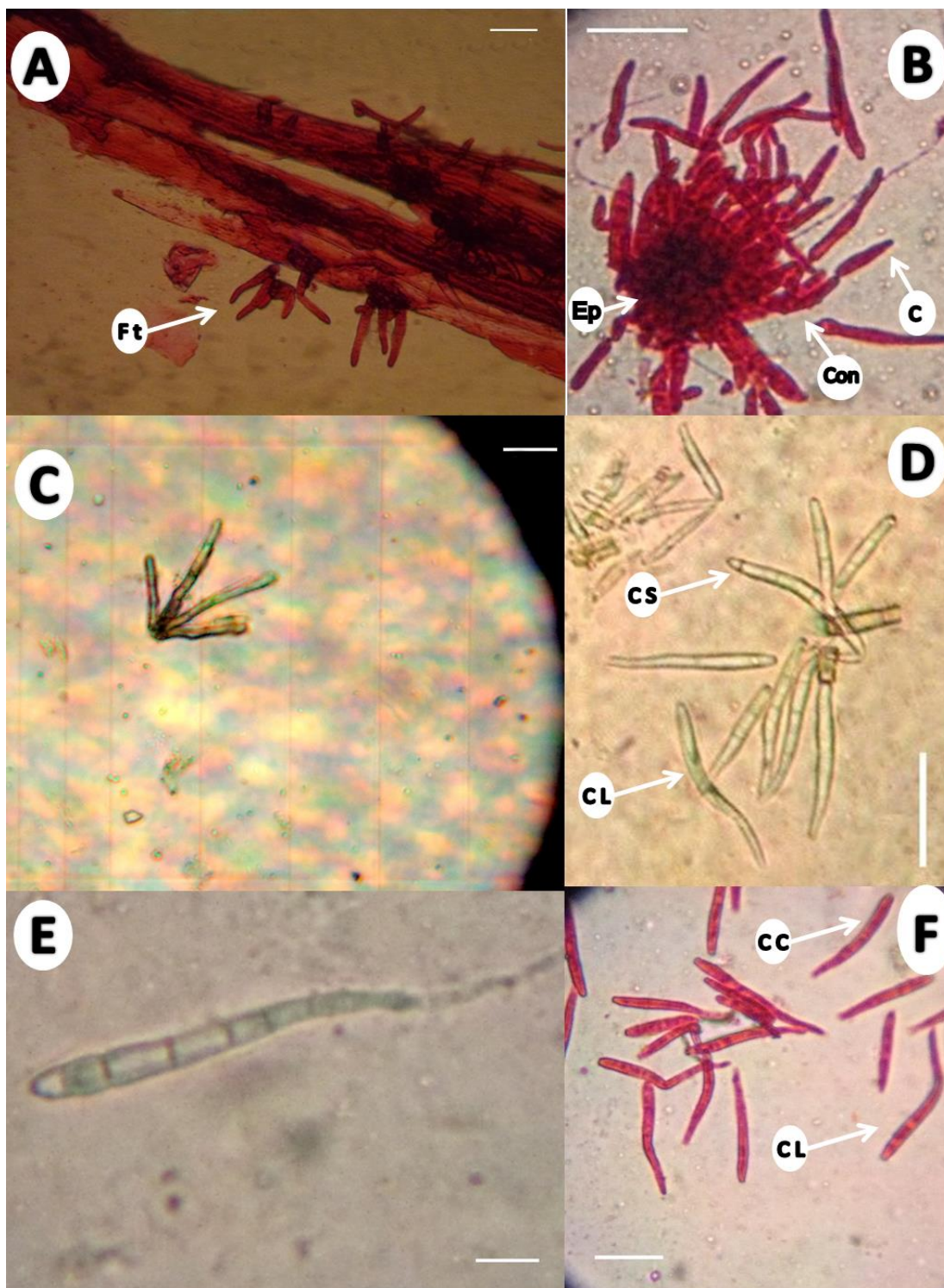
No isolamento indireto, apenas foi possível isolar o fungo em amostras de folhas e ramos, porém 90% do isolamento foi obtido quando se utilizou ramos sintomáticos, uma vez que dos quatro isolamentos feitos, em apenas dois foi possível isolar o fungo: duas placas utilizando folhas e quatro placas para ramos.

A dificuldade do isolamento indireto ocorreu devido ao crescimento lento do fungo, pois, fungos saprófitos, que se alimentam de matéria orgânica animal ou vegetal morta, presentes nos órgãos utilizados, cresciam rapidamente cobrindo a colônia, impossibilitando o seu isolamento. Muitos pesquisadores relataram que as espécies do gênero *Cercospora* apresentam crescimento lento em meios de cultura artificiais (SILVA et al., 1988; DEL PELOSO et al., 1989; QUEIROZ e MENEZES, 1993; RIBEIRO et al., 1997; ROSA e MENEZES, 2000; ÁVILA e PITELLI, 2004; SWAMY et al., 2012). Estes autores tentaram determinar condições de cultivo para o crescimento e esporulação de *Cercospora* spp. por meio de variáveis como composição do meio de cultura, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e pH.

Nas avaliações das estruturas fúngicas presentes nas amostras de folhas, ramos e pedúnculos, após 12 horas de inoculação ao microscópio óptico, pôde-se observar a formação de frutificações nos tecidos dos ramos (Figura 2A). Foram observados também fascículos de esporodóquio variando de 2 a 20 talos de conidióforos simples, eretos, com alguns ligeiramente flexionados, septados ou não com presença de estroma e conídios hialinos, filiformes e ligeiramente curvos, multiseptados e lisos de cor marrom escuro, retos e curvos com verificação de esporos grande e pequenos na ponta truncada (Figuras 2B e 2C).

Os conídios apresentaram-se hialinos, cilíndricos, suavemente curvo e raramente obláveo, com presença de conídios lisos e multiseptados, com base truncada para subtruncada e ponta sub-abtusa para subaguda (Figura 2D, E e F). Características estas semelhantes às características do fungo *C. capsici* observadas por Gilchrist (1925); Chupp (1953); Meon (1990) Barnett e Hunter (1998) e Groenewald et al. (2013).



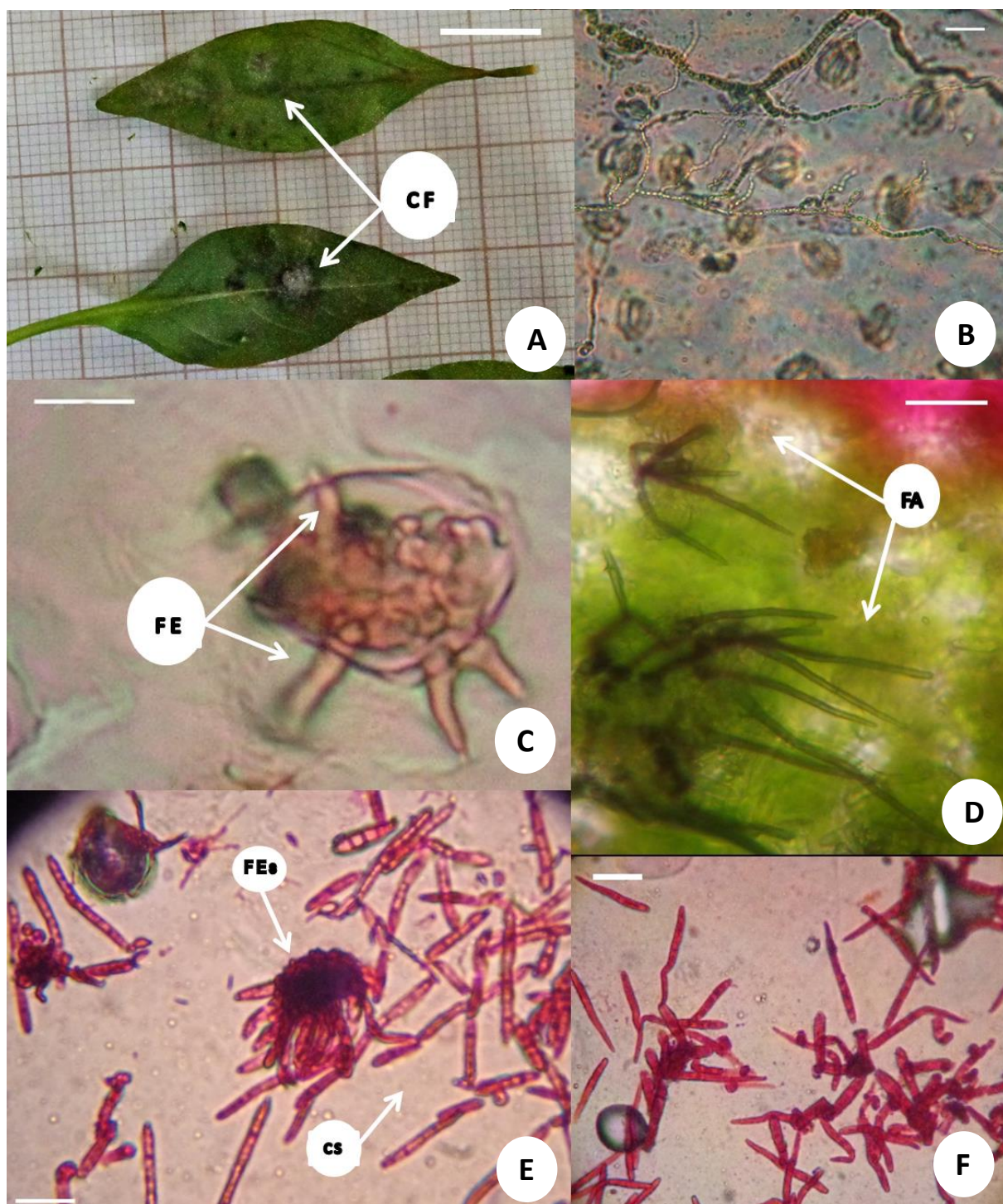


**Figura 2.** Estruturas fúngicas em amostras de folhas, caules e pedúnculos e meios de culturas. A. Tecido lesionado de ramo de pimenteira com seta indicando frutificações fúngicas (Ft). Escala=1 $\mu$ m. B. As setas indicam esporodóquio (Ep) com talos de conidióforos (Con) com conídios grandes e pequenos (C) na sua ponta rodeada de conídios. Escala= 1 $\mu$ m. C. Conidióforos de coloração marrom septado obtido de meio de cultura. Escala= 1 $\mu$ m. D. As setas indicam conídios septados (CS) e lisos (CL). Escala=1 $\mu$ m. E. Conídio Septado obtido de meio de cultura. Escala= 1 $\mu$ m; F. Conídios lisos (CL) e curvos (CC). Escala= 1 $\mu$ m. Areia, PB, UFPB/CCA, 2011.

Na confirmação do postulado de Koch, todas as folhas inoculadas com solução patogênica, nas quatro repetições, apresentaram formações de estruturas fúngicas na face superior das folhas destacadas, 72 horas após a inoculação. Com isso a cercospora mostrou-se patogênica à pimenteira. Apesar de as folhas não terem apresentado sintomas característicos da doença, estas apresentaram no mínimo uma e o número máximo 22 colônias de variados tamanhos com formato circular e coloração branca, distribuídas em pontos isolados das folhas (Figura 3A).

Em média 3,89 colônias por folhas foram observadas. A presença de formação destas colônias nas folhas são características do início da infecção (CHUPP, 1953; MEON, 1990; MONTEIRO et al., 2000; LOPES e ÁVILA, 2003, PINTO et al., 2011 e LOPES et al., 2011). Meon (1990) cita que os conídios de *C. capsici* iniciam a germinação após 48 horas e se ramificam a partir das 72 horas na superfície foliar. O autor relata também que os sintomas de queima iniciam-se a partir de 10-14 dias após a inoculação. Esta é a explicação do não surgimento das lesões nas folhas inoculadas neste estudo.





**Figura 3.** A. As setas indicam colônias fúngicas (CF) na face adaxial da folha de pimenteira. Escala=1µm. B. Crescimento e a colonização do fungo na face abaxial das folhas. Escala = 5µm C. Formação de frutificações nos estômatos (FE); D. Frutificações anfégenas (FA) de cor marrom na face abaxial das folhas destacadas de pimenteira Escala = 5µm. E. Fascículo de esporodóquio (FEs) com talos de conidióforos rodeados de conídios septados (CS). Escala= 1 µm. F. Conídios lisos. Escala= 1µm. Areia, PB, UFPB/CCA, 2011.

Nas avaliações das estruturas fúngicas das colônias presentes nas folhas em microscópio óptico pôde-se notar o crescimento e a colonização do fungo na face abaxial das folhas destacadas, bem como a formação de frutificações nos estômatos (Figuras 3B e C).

Frutificações anfigenas de cor marrom também foram observadas na face abaxial das folhas destacadas de pimenteira (Figura 3D) como observado por Chupp (1953); Meon (1990) em folhas de pimentões.

Nas observações ao microscópio óptico das folhas inoculadas foram visualizadas as mesmas estruturas observadas nas avaliações feitas nas amostras de folhas, caule e pedúnculo (Figuras 3 E e F). Não foi observada presença de estruturas fúngicas no tratamento controle. Estas características morfológicas não diferem das descrições apresentadas por Heald e Wolf (1911) para *Cercospora capsici*. Gilchrist (1925); Chupp (1953); Meon (1990) também relataram características morfológicas semelhantes ao do fungo, corroborando coletivamente com a descrição do presente isolado como *Cercospora capsici* Heald e Wolf.

### 3.4 CONCLUSÕES

Há variabilidade nos genótipos de pimenteiras avaliados para a reação da Cercosporiose.

Identificou-se o fungo *Cercospora capsici* Heald e Wolf como causador de manchas em espécies de pimenteiras, cultivadas em casa de vegetação na cidade de Areia, PB.

O método de isolamento direto foi o mais eficiente para o isolamento de *C. capsici* e o indireto mais efetivo para ramos.

### 3.5 REFERÊNCIAS

ABCSEM - Associação Brasileira do Comércio de Mudanças e Sementes. 2007. **Pesquisa**

AGROLINK. Cercospora. 2010. Disponível em:

<[http://agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/cercospora\\_1671.html](http://agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/cercospora_1671.html). Acesso em: 17 de janeiro de 2015.

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, A.F.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R.C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Editora UFV. 382 p. 2007.

ALFENAS, A.C. MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Editora UFV. 382 p. 2007.

AMORIM, L.; SALGADO, C.L. **Diagnose**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.224-232. 1995.

ÁVILA, Z.R. e PITELLI, R.A. Crescimento, esporulação e virulência do inoculo de *Cercospora piaropi*, agente de biocontrole do aguapé. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 29, p. 189-192. 2004.

BARNETT, H.L. & B.B. HUNTER. Illustrated genera of imperfect fungi. 4. ed. St. Paul, MN. **American Phytopathological Society**, St. Paul, USA, 218p. 1998.

BASAK, A.B., A comparative study on dry weight loss due to major fruit rot diseases of chilli. **Chittagong University Studies**, Chittagong, Bangladesh, v.18, p.129-131. 1994.

BENTO, C.S.; SUDRE, C. P.; RODRIGUES, C.; RIVA, R. M.; PEREIRA, E.M.G. Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre genótipos de pimentas. **Scientia Agraria**, Curitiba, Brasil, v.8, n.2, p. 149-156. 2007.

BHAT, F.A.; DAR, G.M.; TELI, M.A.; AHMAD, M. F. Frogeye Leaf Spot of Bell Pepper in Kashmir: Prevalence and Cause. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, Karnataka, Bangalore, v.21, n. 3, p. 460-461. 2008.

BRITO, A.H.; PINHO, R.G.V.; SOUZA FILHO, A. X.; ALTOÉ, T. F. AVALIAÇÃO DA Severidade da Cercosporiose e Rendimento de Grãos em Híbridos Comerciais de Milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, Brasil, v.7, n.1, p. 19-31. 2008.

CHUPP, C., 1954. A Monograph of the Fungus Genus *Cercospora*. Ithaca, Disponível em: <NYdadosdosegmento.php.> Acesso em 17 de janeiro de 2015.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Versão Windows; Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 382p. 2013.

DANTAS, B. A ocorrência da “ Cercosporiose” da bananeira no Brasil, *Cercospora musae* Zimm. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte** v.14, p.1-29. 1948.

DEL PELOSO, M.C., FERNANDES, C.D., FILGUEIRAS, A.T. & CHAVES, G.M. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Brasil, v.14, p.41-44. 1989.

DONG, H.; JIANG, Y.; WANG L.; XU, X.; LIU, L. Identification and Evaluation of Maize Hybrids Resistance to *Cercospora zea-maydis*. **Journal of Maize Sciences**, Mainland, China, v. 3. 2007.

IBGE/SIDRA. Levantamento sistemático da produção agrícola. 2010. Disponível em: [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br). Acesso em 17 de janeiro de 2015.

JUN, S.; ZHI-HENG, L.; HONG, Y.; SHA, L.; CONG, T. Sensitivity of *Cercospora capsici* Heald.et Wolf. to nine fungicides. **Chinese Journal of Tropical Crop**, Hainan, China, v. 12, p. 1. 2009.

KÖPPEN, W. *Das geographische System der Klimate*. In: Handbuch der Klimatologie, edited by: Köppen, W. and Geiger, G., 1. C. Gebr, Borntraeger, 1–44, 1936.

LOCH, L. C.; CARVALHO, M. G. de; OLIVEIRA, L. M. de. Esporulação de *Cercospora capsici* em meio de cultura. **Experientiae**, Viçosa, v. 19, n. 12, p. 259-286. 1975.

LOPES, C.A. e ÁVILA, A.C. Doenças do pimentão: diagnose Doenças do pimentão: diagnose e controle. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**, 96 p. 2003.

LOPES, C.A.; HENZ, P.G.; REIS, A. **Doenças das Pimenteiras e seu Controle**. In: RÊGO, E.R.; FINGER, L.F.; RÊGO, M.M. Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum spp.*). Areia, Universidade Federal da Paraíba. 223p. 2011.

MATSUOKA, K.; VANETTI, C.A.; COSTA, H.; PINTO, C.M.F. Doenças causadas por fungos em pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.184, p.64-66. 1996.

MENEZES, M. & ASSIS, S.M.P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2ª. Ed. Recife PE. Imprensa Universitária, UFRPE. 2004.

MEON, S.. Infection of chilli by *Cercospora capsici*. **Pertanika Journal of Science & Technology**, Selangor. Malásia, v. 13, n. 3, p. 321-325. 1990.

MICHEREFF, S.J.; MARTINS, R.B.; NORONHA, M.A.; MACHADO, L.P. Sample size for quantification of cercospora leaf spot in sweet pepper. **Journal of Plant Pathology**, Bari, Itália, v. 93, n. 1, p. 183-186. 2011.

MICHEREFF, S.J.; NORONHA, M.A.; ANDRADE, D.E.G.T.; OLIVEIRA, E.P.; XAVIER FILHA, M.S.; MOREIRA, P.A.A. Elaboração e validação de escala diagramática para a cercosporiose do pimentão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, Brasil, v. 32, p.260-266. 2006.

MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. **Doenças causadas por fungos e bactérias em pimentão e pimenta**. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Ed.) Controle de doenças de plantas: hortaliças. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v.2, p.637-675. 2000.

NAGEL, C.M. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. **Phytopathology**, Oxford, Inglaterra, v.24, p.1101-1110. 1934.

NICOLI, A., ZAMBOLIM, L., NASU, E.G.C., PINHO, D.B., PEREIRA, O.L., CABRAL, P.G.C., ZAMBOLIM, E.M., First report of *Cercospora apii* leaf spot on *Capsicum chinense* in Brazil. **Plant Disease Journal**. Saint Paul, USA, v.95, p.11-94. 2011.

PARAÍBA (Estado) Instituto de Desenvolvimento Municipal e Estadual – IDEME. Agricultores vão receber incentivos fiscais para a instalação de indústrias. 2009. Disponível em: <<http://www.paraiba.pb.gov.br/17108/agricultores-vao-receber-incentivos-fiscais-para-a-instalacao-de-industrias.html?theme=active>> Acesso em: 17 de janeiro de 2015.

PARAÍBA (Estado) Instituto de Desenvolvimento Municipal e Estadual – IDEME. Agricultora familiar garante renda na produção de pimenta orgânica. 2012. Disponível em: <<http://www.paraiba.pb.gov.br/51379/agricultora-familiar-garante-renda-na-producao-de-pimenta-organica.html>> Acesso em: 17 de janeiro de 2015.

PHENGSTHAM P, BRAUN U, MCKENZIE EHC, CHUKEATIROTE E, CAI L, HYDE KD. Monograph of cercosporoid fungi from Thailand. **Plant Pathology & Quarantine**, Chiang Rai, Tailândia, v. 3: p. 19–90. 2013.

QUEIROZ, F.M. & MENEZES, M. Efeito de meios de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Brasil, v.18, p.545-547. 1993.

RÊGO, E.R.; FINGER, L.F.; NASCIMENTO, M.F.; BARBOSA, L.A.; SANTOS, R.M.C. **Pimenteiras Ornamentais**. In: RÊGO, E.R.; FINGER, L.F.; RÊGO, M.M. Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum spp.*). Areia, Universidade Federal da Paraíba. 223p. 2011.

RÊGO, E.R.; SANTOS, R.M.C.; RÊGO, M.M.; NASCIMENTO, M.F.; NASCIMENTO, N.F.F.; SILVA, A.M. **Produção de mudas e disponibilização de cultivares de pimenteiras: sustentabilidade, inclusão social e geração de trabalho e renda nas comunidades de Macacos e Furnas no brejo paraibano**. In: MIRANDA V.C.M., SOBRINHO RGS & RÊGO ER (Eds.) Sustentabilidade, Inclusão Social e Geração de Trabalho e Renda - Perspectivas de Extensão Universitária. Areia, Universidade Federal da Paraíba. p.11-30. 2012.

RIBEIRO, Z.M.A., MELLO, S.C.M., FURLANETTO, C., FIGUEIREDO, G. & FONTES, E.M.G. Characteristics of *Cercospora caricis*, a potencial agent of *Cyperus rotundus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Brasil, v. 22, p. 513-519. 1997.

ROSA, R.C.T. e MENEZES, M. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de *Pseudocercospora musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Brasil, v. 26, p.141-147. 2001.

SHARMA, S. K., Efficacy of different fungitoxicants against frog-eye leaf spot of bell pepper. **Plant Disease Research**, New Delhi, Índia, v.13 p. 62-63. 1998.

SILVA, M.F., CAVALCANTE, M.A., POROCA, D.M. & LIMA, D.M. Cultivo e esporulação de *Cercospora caribaea* e *C. henningsii*, agentes causais de manchas foliares em mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Brasil, v.13, p.54-58. 1988.

SILVA, R. C. S. Mancha preta causada por *Cercospora Capsici* em folhas de pimentão (*Capsicum Annuum*). Estudos em Doenças de Plantas. Disponível em: <<http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/04/mancha-preta-causada-por-cercospora.html>> Acesso em: 27 de fevereiro de 2015.

SWAMY, K. M.; NAIK, M.K.; PATIL, S.; AMARESH, Y.S. Growth of *Cercospora capsici* on different solid and liquid media. **Journal of Mycopathological Research**, Kolkata, India, v. 50, n.2, p. 313-316. 2012.

THORNTHWAITE, C.W. Na approach toward a rational classification of climate. *Geographical Review*. v.38, p.55-94, 1948.

WELLES, C. G. **Taxonomic studies on the genus *Cercospora***, 1923, 24 f. Dissertação (Mestrado). University of Wisconsin—Madison. 1923.

YAMAMOTO, S.; NAWATA, E. *Capsicum frutescens* L. in Southeast and East Asia, and its dispersal routes into Japan. **Economic Botany**. Western Cape, África do Sul, v. 59, p. 18-28. 2005.

## **4 CULTIVO DE *Cercospora capsici* E PRODUÇÃO DE CERCOSPORINA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

Aline da Silva Santos; Mailson Monteiro do Rêgo; Elizanilda Ramalho do Rêgo;  
Lucas Chaves Cavalcante; Tayron Rayan Sobrinho Costa

### **RESUMO**

A cercosporiose é uma grave doença por provocar desfolha prematura nas pimenteiras, causada por fungos do gênero *Cercospora*, que se caracterizam por produzir uma toxina, cercosporina, com função essencial na patogênese de seus hospedeiros. Assim, objetivou-se induzir o crescimento e a produção de cercosporina de *Capsicum* em diferentes meios de cultura. Para isso, foram coletados órgãos infectados de pimenteiras cultivadas em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB/CCA) Campus II, Areia – PB, para isolamento do fungo no Laboratório de Biotecnologia do mesmo Centro. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meios de culturas à base de leite de coco, água de coco, suco V8, extrato de folhas pimenteiras e água-ágar. Foram avaliados o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), a área total média da colônia (ATMC) e a área média total da coloração vermelha (AMTCV) e a quantidade da toxina cercosporina por disco micelial (QTDM). Através das análises dos dados observou-se que o meio à base de ágar promoveu o maior crescimento micelial e o meio à base de extrato de folhas de pimenteira o maior tamanho da colônia. Todos os meios com exceção do meio ágar-água (A-A) induziram a produção de cercosporina pelo fungo *Cercospora capsici*. No entanto, o meio água de coco (ACO) promoveu a expansão da toxina em toda a placa de Petri e obteve a maior quantidade de cercosporina por disco micelial. O meio à base de ágar promoveu o maior crescimento micelial e à base de extrato de folhas de pimenteira o maior tamanho da colônia. Todos os meios com exceção do meio A-A induziram a produção de cercosporina. O meio ACO promoveu a expansão da toxina em toda a placa e obteve a maior quantidade de cercosporina por disco micelial

**Palavras-chave:** Toxina; crescimento micelial; cercosporiose



## ABSTRACT

### ***Cercospora capsici* CULTURE AND CERCOSPORIN PRODUCTION IN DIFFERENT CULTURE MEDIA**

The cercospora leaf spot is considered an important disease because it causes a premature leave decai in chili plants. This disease is caused by fungi of Cercospora genre, that are known by a toxin production, the cercosporin. Thus, it was induced the grown and the produce of the cercosporin *Capsicum*l in diferentes culture ways. For this, it was collected infected organs of the plants, grown in greenhouse in the Agrarian Sciences Center of Paraiba Federal University (UFPB/CCA) Campus II, Areia – PB, and the Biothechnology Laboratory of the same center was used for the fungi isolation. The isolated was grown in Petri dishes with culture ways with coconut milk base, coconut water, V8 juice, chili leaves extract and agar water. It was studied the micelial grown speed (IVCM), the media total area of the colony (ATMC), the total area of the colony (ATMC), and the total area of the red color (AMTCV), and the quantity of toxin cercosporin for micelial disc (QTDM). With the data analysis, it was possible to observe the agar way promote the biggest micelial grown and the chili leaf extract promoted the biggest colony. All the ways, except the water-agar way (A-A) induced the productionof cercosporinby the fungus *Cercospora capsici*. However the coconut water way (ACO) promoted the expansion of the toxin in all the Petri dish and obtained the bigger quantity of cercosporin for micelial disc. The ACO way promoted the expansion of the toxin in all the plaque and obtained the bigger quantity of cercosporin for micelial disc.

**Keywords:** Toxin, mycelial growth, cercospora spot.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A família Solanaceae está presente em diversas partes do mundo e tem como prováveis centros de origem as Américas Central e Sul. Esta família é composta de cerca de 98 gêneros, com aproximadamente 2400 espécies (HUNZIKER, 2001). Inseridas nesta família, estão gêneros de espécies de grande importância econômica como o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e Pimentas e pimentões (*Capsicum* spp).

O gênero *Capsicum* é composto pelas pimenteiras, que apresentam ampla variabilidade, possuindo aproximadamente 33 espécies, domesticadas, semidomesticadas e silvestre. As domesticadas, são representadas por cinco espécies: *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. e *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav (PICKERSGILL, 1997 e REIFSCHNEIDER, 2000).

As pimenteiras são consumidas na forma *in natura* e processadas em diferentes produtos. Estas plantas podem ainda ser comercializadas como ornamental e utilizadas em diferentes áreas industriais como a farmacêutica, alimentícia, cosmética e bélica (PINTO et al., 2007). O seu cultivo no Brasil é realizado basicamente por pequenos produtores da agricultura familiar agregado à agroindústria, o que contribui para o aumento da renda e da fixação da mão-de-obra rural no campo (YAMAMOTO e NAWATA, 2005). Isso, porque o consumo desta hortaliça, processada, vem aumentando devido à estabilização econômica do país, que contribuiu para a melhoria do poder aquisitivo da classe média brasileira (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS, 2013).

No Brasil, as pimenteiras estão com 13,5% do valor total de exportação de hortaliças, ficando em segundo lugar em volume de exportação no país, tendo Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul os principais produtores (ESTEVES, 2011 e AGRIANUAL, 2012). Em 2009 foram comercializados 560,38 kg de sementes de cultivares de pimenteiras pungentes e não pungentes, estimando uma área cultivada aproximada de 1.880,37 ha (ABCSEM, 2009).

Apesar do crescente aumento na produção e exportação desta hortaliça no país, os produtores ainda utilizam sementes de cultivares não adaptadas às regiões, o que contribui para o surgimento de doenças causadas por diferentes agentes patogênicos como vírus, bactérias, nematoides e fungo, tendo como exemplo a cercosporiose.

Esta doença é causada pelos fungos: *Cercospora capsici* Heald & Wolf, que é encontrado em cultivos de todo os continentes, principalmente em regiões tropicais, a temperaturas entre 18 a 25 °C e umidade relativa acima de 90%, *Cercospora apii* Fresen

isolado de *Capsicum chinense* Jacq., em Minas Gerais (NICOLI et al., 2011) e *Cercospora capsicigena* Bhartiya, R. Dubey & S.K. Singh encontrado na Índia, Laos e Tailândia (PHENGSIINTHAM et al., 2013).

A cercosporiose é considerada uma das principais doenças fúngicas das pimenteiras por causar grandes prejuízos à sua produção, pois, além provocar manchas acinzentadas nas folhas, ramos e pedúnculos dos frutos, reduz a área foliar, quando em estágio severo da doença, podendo ocasionar a morte da planta (MATSUOKA et al., 1996 e AGRIOS, 2005).

As espécies de *Cercospora* são caracterizadas pela produção de um metabolito secundário de origem policetídeo, pertencendo ao grupo químico das perilenoquinonas, chamado de toxina cercosporina.

A toxina apresenta coloração vermelha e tem função essencial na patogênese de seus hospedeiros. A função patogênica da cercosporina está ligada a sua capacidade de absorver energia luminosa, ocasionando um estímulo e convertendo oxigênio em espécies de oxigênio tóxicos. Estas espécies de oxigênios provocam a ruptura da membrana e a morte das células vegetais proporcionando a saída de nutrientes para os espaços intercelulares da folha, permitindo o crescimento e esporulação do fungo (ASSANTE et al., 1977; FAJOLA, 1978; DAUB e BRIGGS, 1983).

Outras características do gênero *Cercospora* é o crescimento lento e a falta de esporulação em meios sintéticos, que contribui com a dificuldade do isolamento e purificação destes fungos (NAGEL, 1934; DANTAS, 1948; DEL PELOSO et al., 1989). Com isso, vários trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de determinar condições ideais para o seu cultivo e crescimento, avaliando diferentes variáveis como composição do meio, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e pH (SILVA et al., 1988). Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento e a produção de cercosporina do fungo *Cercospora capsici*, isolado de órgãos infectados de pimenteiras em diferentes meios de cultura.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Obtenção do fungo

Para obtenção do fungo, órgãos infectados como folhas, ramos e pedúnculo, de pimenteiras ornamentais cultivadas em casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II, Areia – PB, foram coletados e encaminhados para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal deste Centro para isolamento do mesmo.

Inicialmente, as amostras foram lavadas com água e detergente neutro e, posteriormente, desinfestadas superficialmente com álcool a 70% por um minuto, hipoclorito de sódio a 30% por dois minutos e enxaguada em água destilada esterilizada (ADE) duas vezes durante um minuto (ALFENAS e MAFIA, 2007) e secos com papel de filtro autoclavado.

O isolamento seguiu a metodologia descrita por Meon (1990), com modificações. Após a desinfestação, as amostras de folhas, ramos e pedúnculos contendo uma lesão com diâmetro entre 3-4 mm foram cortadas em pequenos pedaços de 0,5 cm e incubadas em câmara úmida por 24 horas dentro de estufas incubadoras para BOD (*Biochemical Demand for Oxigêni*-Demanda Bioquímica de Oxigênio) ELETROLabe EL 202 a  $20 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 12 horas.

Após a incubação, as estruturas fúngicas presentes nas amostras foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) (500 mL de extrato obtido de 200 g batata, 20 g de dextrose 17 g de ágar e 500 mL de água), com auxílio de uma lupa binocular Euromex Novex Ar Bino e de uma lâmina de bisturi.

As placas com as estruturas fúngicas foram mantidas sob incubação em BOD a  $20 \pm 2$  °C com fotoperíodo de 12 horas, por dez dias. Após o período de incubação foi realizada transferências de fragmentos de hifas em processos consecutivos até a obtenção de culturas puras e uniformes.

Após a purificação do isolado, discos de 5mm de diâmetro foram retirados da colônia fúngica e colocados dentro de placas de Petri contendo cinco meios de culturas (Tabela 1). Estas foram incubadas nas mesmas condições já citadas anteriormente.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, representada por quatro placas, sendo cada parcela constituída de cinco meio de cultura. Na mensuração da absorvância foram feitas três leituras por placa, da fitotoxina. Os dados foram

transformados em  $\sqrt{X + 0,5}$  e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para análise dos dados foi utilizado o programa Genes (CRUZ, 2013).

As avaliações foram realizadas a cada três dias, mensurando, perpendicularmente, dois diâmetros da colônia, com auxílio de um paquímetro para cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial, calculado utilizando a fórmula de Maguire (1962) adaptada por Oliveira (1991):  $IVCM = \sum (D - D_a) / N$ , em que IVCM = Índice de velocidade de crescimento micelial, D = Diâmetro médio atual,  $D_a$  = Diâmetro médio do dia anterior, e N = Número de dias após a inoculação. Com auxílio do programa ImageJ 1.49r., foram mensurados a área final da colônia aos 60 dias após inoculação (ATMC), Área total de coloração vermelha produzida pelos micélios (OLIVEIRA, 1991; ROSA, 2001).

**Tabela 1.** Componentes dos meios de cultura utilizados para induzir o crescimento micelial e produção de cercosporina de *Cercospora capsici* isolado de cultivos de pimentas ornamentais no município de Areia-PB. Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.

Meios de cultura	Siglas	Componentes dos meios de cultura (1 litro)
Leite de Coco – ágar	LCO-A	100 mL de leite de coco “Sococo” + 10 g de dextrose + 17 g de ágar + 900 mL de água destilada
Água de Coco - ágar	ACO-A	100 mL de água de coco maduro natural + 10 g de dextrose + 17 g de ágar + 900 mL de água destilada
Suco V8 – ágar	V8-A	200 mL de suco V8 “Campbell” + 17 g de ágar + 800 mL de água destilada
Pimenta-ágar	P-A	200 mL de sumo de pimenta obtido de 500 g de folhas de pimenta + 17 g de ágar + 500 mL de água destilada
Água-Ágar	A-A	100 mL de água destilada + 17 g de ágar

\*Todos os meios de cultura preparados foram autoclavados a 120°C por 20 minutos.

#### 4.2.2 Extração e quantificação da cercosporina

Para extrair e quantificar a cercosporina utilizou-se a metodologia descrita Chung (2003), onde três discos miceliais 4 mm de diâmetro de cada placa de petri foram colocados em 8 mL de KOH 5 N durante 4 horas no escuro a 5 °C. As leituras de absorvância foram feitas em um espectrofotômetro Bel Photonics SP 2000 UV nas absorvâncias (A) de 480 nm, 595 nm e 640 nm.

A concentração de cercosporina foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 23,300 para as leituras de 480 nm (JENNS et al., 1989). As amostras que apresentaram coloração esverdeada e leitura nas três absorvâncias foram consideradas produtoras de cercosporina. Para determinar a concentração de cercosporina por placa, o resultado foi dividido por três.

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos meios Leite de Coco (LCO) e Água de Coco (ACO) foi observada a presença de pigmentação vermelha sobre, sob e ao redor das colônias fúngicas com tonalidades variando de escura a média, respectivamente (Figuras 1 A e C). No entanto, no meio LCO foi observado que a pigmentação vermelha concentrou-se nas bordas e embaixo da colônia desde o início do crescimento micelial (Figura 2: A e B), não havendo expansão da pigmentação no meio, porém a cor da pigmentação apresentou-se mais escura do que o meio ACO.

A cor vermelha intensa e a concentração da proteína nas bordas das colônias deve-se, provavelmente, à presença de lipídios presentes na sua composição que funcionou como uma barreira de impedimento da expansão da pigmentação (HENÃO, 1991; TACO, 2006).

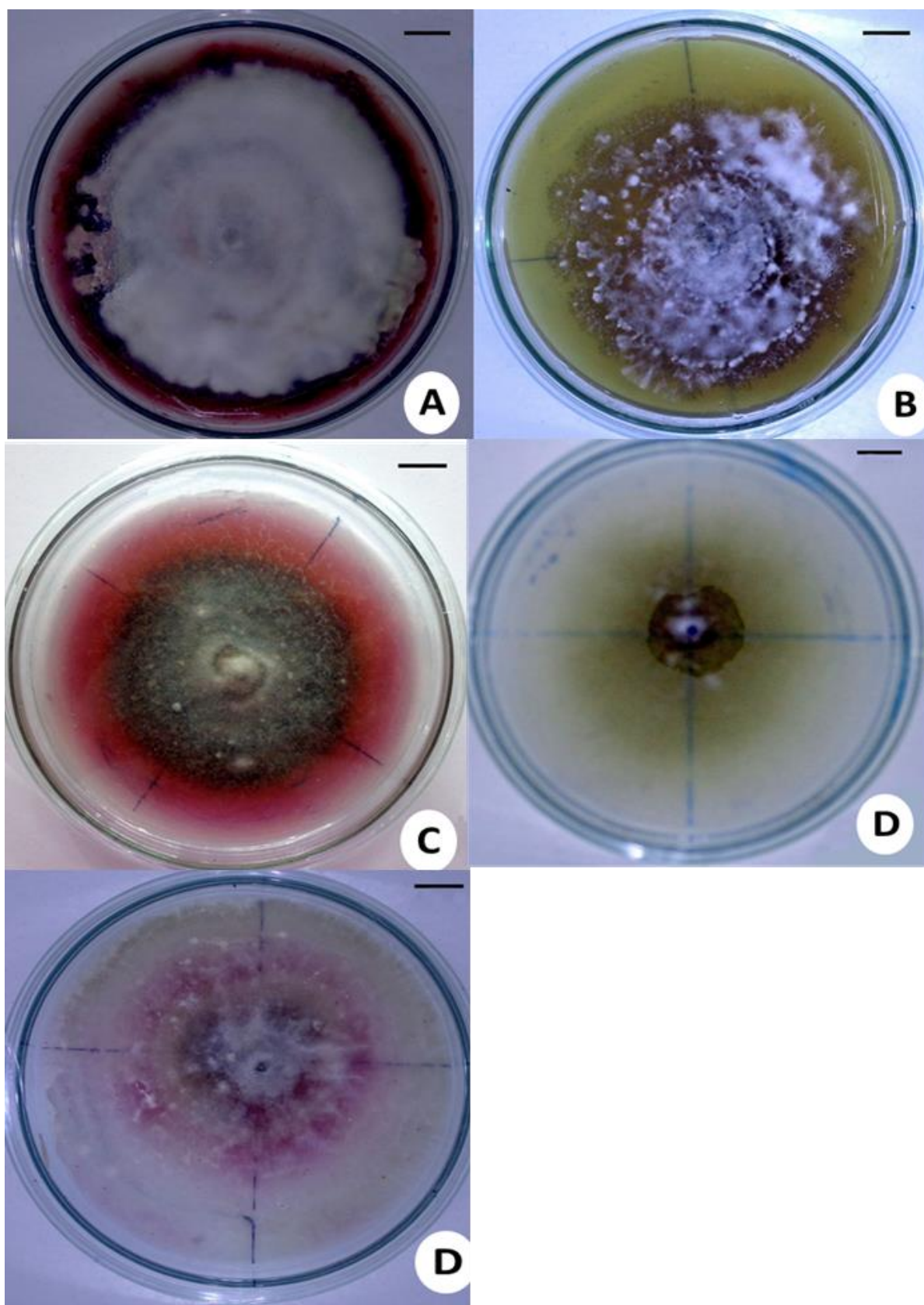
O meio ACO promoveu a produção do pigmento vermelho na sétima leitura do crescimento micelial, expandindo-se da borda da colônia até a completa tomada do meio (Figura 2 C). Contudo, a relatos que a produção de cercosporina inicia-se dois dias após a transferência da colônia fúngica para o meio de cultura ou tecidos lesionados de plantas infectadas (JENNS et al., 1989 e ROBESON et al., 1993).

O atraso na produção da pigmentação vermelha pela *C. capsici* no meio ACO, deve-se à presença de cálcio na sua composição (CHUNG, 2003), uma vez que o cálcio contribui para a indução da cercosporina. Este meio também contém outros ingredientes necessários para a produção da pigmentação avermelhada no meio de cultura como sódio, açúcares, proteínas totais, potássio, magnésio e cloro e não apresenta lipídios na sua composição (HENÃO, 1991; ROCA e MROGINSKI, 1991; VIGLIAR et al., 2006).

Manchas vermelhas também foram observadas em cima das colônias fúngicas cultivadas no meio à base do suco de tomate (Figura 1D e 2D). A presença de pigmentação avermelhada típica da toxina e de hifas vermelhas nos meios são características observadas em isolados de espécies de cercosporas que produzem grande quantidade de toxina, o que caracteriza um isolado altamente virulento, uma vez que a cercosporina tem função essencial na patogênese do fungo (KOSHIKUMO et al., 2014 e DAUB et al., 2013).

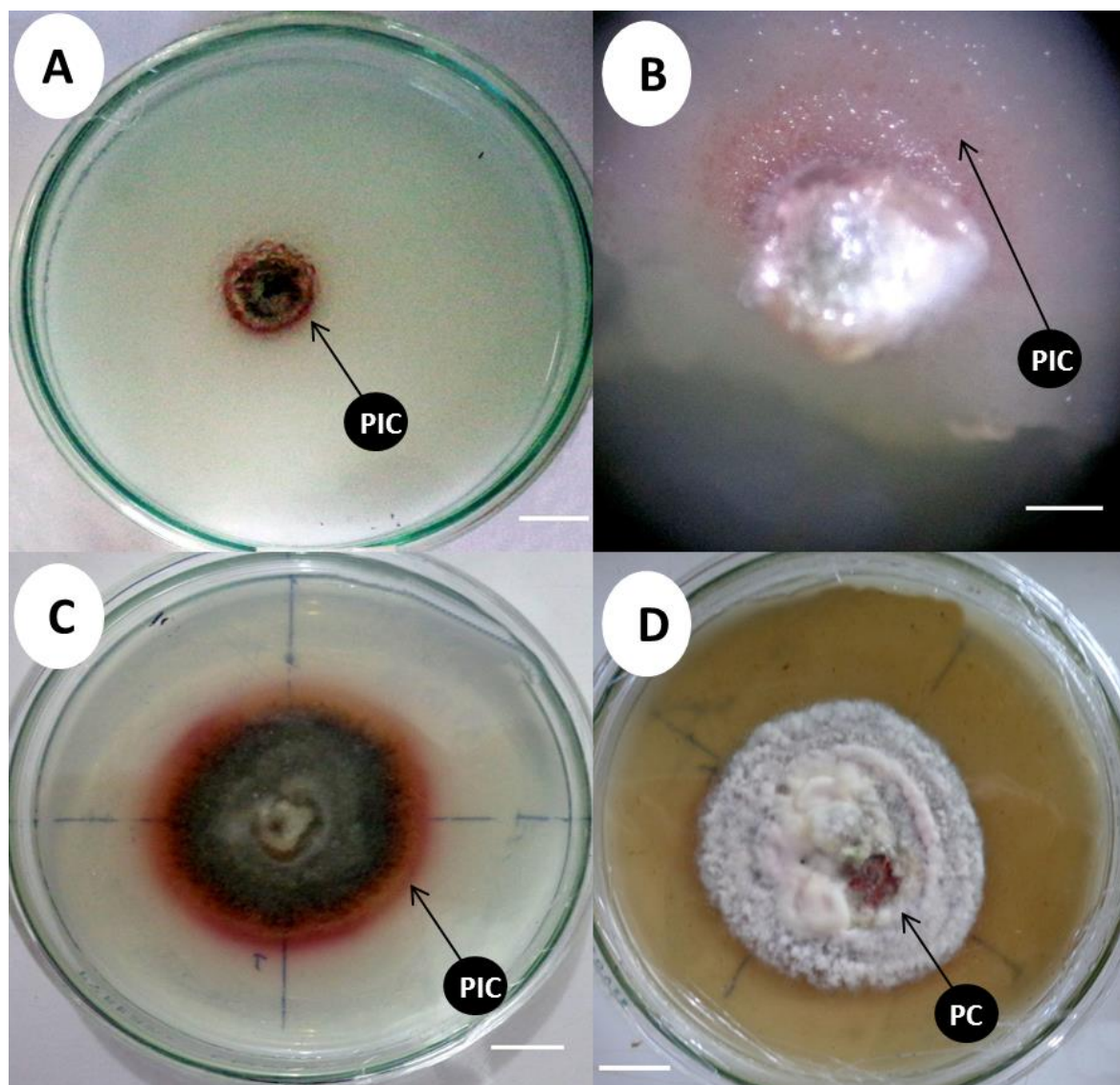
No meio à base de pimenta (P-A) não houve presença de pigmentação vermelha entre/ou nas bordas dos micélios (Figura 1B). Isso, devido a sua constituição nutricional: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês e zinco, que induz a conidiação do fungo (LOCH, 1975; MELLO et al., 2002), uma vez que os meios que induzem a esporulação não induz a produção de cercosporina (DAUB e CHUNG, 2009).

O meio ágar-água (A-A) também não induziu a produção de pigmentação vermelha no meio (Figura 1D), não corroborando com Koshikumo et al. (2014), que observaram a presença de toxina por *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*.



**Figura 1.** Fotomicrografias das colônias após 60 dias da inoculação. A. meio Leite de Coco-LCO. Escala 1 cm. B Pimenta ágar. Escala= 1 cm. C. Água de Coco Escala= 1 cm. D. Ágar-ágar. Escala= 1 cm. E. Suco de Tomate V8-A. Escala= 1 cm. Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.





**Figura 2.** Fotomicrografias das colônias aos 4 dias e aos 20 dias de crescimento: A. Meio Leite coco, seta indica o anel vermelho, produzido pelos micélios, característico de produção de cercosporina (PC). Escala= 1cm. B. Micélios repicados no início do crescimento, iniciando a formação do anel vermelho, característico de produção de cercosporina (PC) em meio LCO. Escala= 1 cm. C. Colônia em meio de cultura água de coco na sétima leitura de crescimento micelial, iniciando a produção de cercosporina (PC). Escala= 1 cm. D. Colônia em meio de cultura Suco V8 na sétima leitura de crescimento micelial, com seta indicando a produção de cercosporina em cima da colônia. Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.

Observou-se efeito altamente significativo ( $P < 0,001$ ) para as variáveis IVCM, ATMC e ATCVM (Tabela 2) e efeito significativo ( $P < 0,05$ ) para a variável QTDM indicando variação do comportamento do fungo quanto ao crescimento e a quantidade de proteína produzida nos meios avaliados.

**Tabela 2.** Análises de variâncias do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM); da área total média da colônia aos 60 dias após repicagem (ATMC); da área total da coloração vermelha produzida pelos micélios (ATCVM) e da quantidade de proteínas por disco micelial (QTPDM). Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.

FV	GL	Q.M.			
		IVCM	ATMC	ATCVM	QTPDM
Meios	4	0,240**	5,272**	4,622**	0,031*
Resíduo	15	0,0012	0,511	0,101	0,006
CV (%)		2,64	17,50	19,466	9,093

Teste de Tukey; \*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade. \*Significativo a 5% de probabilidade. (FV) Fonte de Variação; (GL) Graus de Liberdade; (QM) Quadrados Médios e (CV) Coeficiente de Variação.

O meio de cultura à base de ágar foi o que proporcionou o maior IVCM, seguido do meio à base de pimenta, não havendo diferença entre os demais meios. O IVCM variou de 0,86 a 2,43 mm (Tabela 3), mostrando crescimento inferior aos obtidos por Koshikumo (2011) nas *C. sorghi* f. sp. *maydis* e *C. zeina*, cultivadas em diferentes meios de cultura.

Na ATMC, o meio à base de extrato de pimenta proporcionou o maior tamanho da colônia, não apresentando diferença estatística entre os demais (Tabela 3). Isso, devido este meio ser de material vegetal do hospedeiro, o que induz a produção de conídios (LOCH, 1975). Outro fato que contribuiu para este resultado foi que a síntese de cercosporina *in vitro* é realizada apenas em meios de cultura que propiciam o crescimento vegetativo e é contida em condições nutricionais que induzem o processo de conidiação (DAUB e CHUNG, 2003).

A indução e a detecção da toxina foi observada com maior expressão no meio água de coco, por ser ele rico em nutrientes como açúcares e outros glicídios, aminoácidos e suas amidas e outros medabolitos (HENÃO, 1991; ROCA e MROGINSKI, 1991), que são necessários para a indução de cercosporina. O meio ACO foi o meio a promover a maior expansão da cercosporina, pigmentação vermelha e a maior quantidade de toxina (Tabela 3), devido a presença de cálcio e a ausência de lipídios que podem impedir a expansão da toxina no meio (CHUNG, 2003).

O meio à base de suco V8-A também induziu a detecção e a presença da toxina, discordando de Daub e Chung (2009), que citam que em meios de culturas que favorecem a esporulação como o meio V8 não há favorecimento para produção de cercosporina. No entanto, Koshikumo et al. (2014) relatam a detecção de quantificação de cercosporina em meio à base de suco V8. A QTPDM da toxina varia entre 0,10 a 1,01 nmol disco<sup>-3</sup> (Tabela 3).

Quantidades superiores de cercosporina foram obtidas por Upchurch (1995) em *C. kikuchii* e Koshikumo et al. (2014) em *C. sorghi* f. sp. *maydis* e *C. zeina*.

**Tabela 3.** Média do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM); da área total média da colônia aos 60 dias após repicagem (ATMC) e da área total da coloração vermelha produzida pelos micélios (ATCVM) e da quantidade de proteína por disco micelial (QTPM). Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.

MEIOS	IVCM	ATMC	AMTCV	QTPDM
	Mm	cm <sup>2</sup>	cm <sup>2</sup>	nmol/disco
Ágar-água	2,432 <sup>a</sup>	16,174b	0,000c	0,10e
Leite de Coco	0,737c	11,008b	4,972b	0,49b
Água de Coco	0,870c	11,094b	9,630a	1,01a
V8-A	0,862c	13,216b	0,000c	0,372c
Pimenta	1,265b	36,664a	1,249c	0,33d

\*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si.

Os fragmentos miceliais crescidos em meio Leite de Coco-LCO, quando colocado em meio alcalino, KOH 5N, apresentaram 100% de coloração esverdeada; em contrapartida, os meios água de coco-ACO e suco V8, quando em presença de KOH 5N, as soluções apresentaram de 60,9 a 98,45% de coloração verde. O meio à base de pimenta apresentou 53,93% da solução com coloração esverdeada.

Todos os quatro meios obtiveram picos de absorvâncias nas leituras de 480, 595 e 640 nm, em diferentes quantidades, conforme ocorre com a cercosporina, corroborando com Balis e Payne (1971); Jenns et al. (1989) e Martins (2007) que relataram que a cercosporina em presença de meio alcalino torna-se verde com picos de absorvâncias nas leituras de 480, 595 e 640 nm.

Vários trabalhos também detectaram a presença de cercosporina em meio alcalino em várias cercosporas como Koshikumo et al. (2014) em *Cercospora zeina* e *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*; Almeida et al. (2005) em *C. kikuchii* e Choquera et al. (2007) em *Cercospora nicotianae*

O meio Ágar-água-A-A é o mais carente em nutrientes. Contendo apenas água e Agar e, em meio alcalino, apresentou menos de 1% de placas com coloração esverdeada, porém, os isolados cultivados nesse meio tiveram picos de absorvâncias nas três leituras, não concordando com Koshikumo et al. (2014) que quantificaram teores de cercosporina em todos

os isolados cultivados neste meio, que também foi detectado neste trabalho, porém em baixa magnitude.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Os meios à base de água-ágar e extrato de pimenta promoveram o maior crescimento micelial e com maior velocidade;

Todos os meios com exceção do meio A-A induziram a produção de cercosporina pelo fungo *Cercospora capsici*;

O meio ACO promoveu a expansão da toxina em toda a placa de Petri e obteve a maior quantidade de cercosporina por disco micelial do fungo *C. capsici*.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

ABCSEM - Associação Brasileira do Comércio de Mudanças e Sementes. 2009. *Pesquisa de mercado de sementes de hortaliças*. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/dadosdosegmento.php>. Acesso em: 15 jun. 2013.

AGRIOS, G.N. Plant pathology. 5th ed. Amsterdam: **Elsevier Academic**, 952p. 2005.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa, Minas Gerais, Brasil: UFV. 2007.

ALMEIDA, Álvaro M. R. et al. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Brasil, 2005, v.30, n.6, pp. 594-602. 2005.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS. Santa Cruz do Sul: Gazeta. 92p., 2013.

ASSANTE, G.; LOCCI, K.; CAMARDA, L.; MERLINI, L. AND NASINI, G. Screening of the genus cercospora for secondy, metabolites. **Phytochemistry**, Milano. USA, v.16, p. 243-247. 1977.

BALIS, C. & PAYNE, M. G. Triglycerides and cercosporin from *Cercospora beticola*: fungal growth and cercosporin production. **Phytopathology**, Oxford, Inglaterra, v.61, p. 1477-1484. 1971.

CHOQUERA, M.; LEEB, M.; BAUC, H., CHUNGAD, K. Deletion of a MFS transporter-like gene in *Cercospora nicotianae* reduces cercosporin toxin accumulation and fungal virulence. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Heidelberg, Alemanha, v. 581, p. 489-494. 2007.

CHUNG, K.R., Involvement of calcium/calmodulin signaling in cercosporin toxin biosynthesis by *Cercospora nicotianae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 69, p. 1187-1196. 2003.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Versão Windows; Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 382p. 2013.

DANTAS, B. A ocorrência da “Cercosporiose” da bananeira no Brasil, *Cercospora musae* Zimm. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte** 14:1-29. 1948

DAUB, M. E.; BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by cercosporin. **Plant Physiology**, Glasgow, Reino Unido, v. 71, n. 4, p. 763-766. 1983.

DAUB, M. E.; CHUNG K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in plant pathogenesis: In the Mycota V. Plant Relationships, 2<sup>nd</sup> Edition. H. Deising. Ed **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, p. 201-219. 2009.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. Reactive Oxygen Species in Plant Pathogenesis: The Role of Perylenequinone Photosensitizers. **Discoveries**, Brookline, USA, v. 19, n. 9. 2013.

DEL PELOSO, M.C., FERNANDES, C.D., FILGUEIRAS, A.T. & CHAVES, G.M. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Brasil, v.14, p.41-44. 1989.

ESTEVES M. 2011. As novas variedades de pimenta da Embrapa e o mercado pimenteiro: oportunidade de renda para agricultores. Disponível em: <http://hotsites.sct.embrapa.br/prosarural/programacao/2011/cultivares-de-pimenta-mais-resistentes-e-produtivas-1>. Acessado em 20 janeiro. 2015

FAJOLA, A.O. Cercosporin, A phytotoxin from *Cercospora* spp. **Physiological Plant Pathology**. Maryland, USA, v.13, p.157-164. 1978.

GRIANUAL. Anuário da agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 303p., 2012.

HENÃO, L. M.M. **Cultivo de tecidos vegetales**. Medellin: Universidad Nacional de Colômbia. 1991.

HUNZINKER, A.T. **Genera Solanacearum**. Rugell: A.R.G. Gantner Verlag. 500 p., 2001.

JENNS, A. E.; DAUB, M.E.; UPCHURCH, R.G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by médium and temperature manipulation. **Phytopathology**, Oxford, Inglaterra, v. 79, n.2, p. 213-219. 1989.

KOSHIKUMO, E.S.M. **Identificação molecular e morfológica, métodos de esporulação, detecção de cercosporina das espécies de cercospora de milho**. 2011. 109f. Tese (Doutorado em Agronomia Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais. 2011.

KOSHIKUMO, E.S.M.; ALVES, E.; PINHO, R. G. V. Induction and detection of toxin in *Cercospora zeina* and *Cercospora sorghif. sp. maydis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrária**, Recife, Brasil, v.9, n.1, p.31-35. 2014.

LOCH, L. C.; CARVALHO, M. G. de; OLIVEIRA, L. M. de. Esporulação de *Cercospora capsici* em meio de cultura. **Experientiae**, Viçosa, MG, v. 19, n. 12, p. 259-286. 1975.

MARTINS, B.M. **Variabilidade de *Cercospora coffeicola* em Minas Gerais com base em compatibilidade vegetativa em produção de cercosporina**. 2007. 86f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais. 2007.

MATSUOKA, K.; VANETTI, C.A.; COSTA, H.; PINTO, C.M.F. Doenças causadas por fungos em pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.184, p.64-66. 1996.

MELLO, S. C.; DECHEN, A. R.; MINAMI, K. Influência do boro no desenvolvimento e na composição mineral do pimentão. **Horticultura Brasileira**. Brasília, Brasil. v. 20, n.1, p. 99-102. 2002.

MEON, S.. Infection of chilli by *Cercospora capsici*. **Pertanika Journal of Science & Technology**, Selangor, Malásia, v. 13, n. 3, p. 321-325, 1990.

NAGEL, C.M. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. **Phytopathology**, Oxford, Inglaterra, v.24, p.1101-1110. 1934.

NICOLI, A., ZAMBOLIM, L., NASU, E.G.C., PINHO, D.B., PEREIRA, O.L., CABRAL, P.G.C., ZAMBOLIM, E.M., 2011. First report of *Cercospora apii* leaf spot on *Capsicum chinense* in Brazil. **Plant Disease Journal**. Saint Paul, USA 95, 2011.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. Lavras, Minas Gerais, Brasil: Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras. 1991.

PHENGSIINTHAM P, BRAUN U, MCKENZIE EHC, CHUKEATIROTE E, CAI L, HYDE KD. Monograph of cercosporoid fungi from Thailand. **Plant Pathology & Quarantine**, Chiang Rai, Tailândia, v. 3, p.19-90. 2013.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**. v.96, p.129-133, 1997.

PINTO, C.M.F.; CALIMAN, F.R.B.; MOREIRA, G.R.; MATTOS, R.N.; ROCHA, P.R.R.; VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J. **Pimenta (*Capsicum* spp.)**. In: Paula Júnior, T.J.; Venzon, M. (eds.) 101 Culturas: manual de tecnologias agrícolas. EPAMIG, Belo Horizonte, p. 625-632, 2007.

REIFSCHNEIDER, J.B. ***Capsicum*-Peppers and Chilies in Brazil**. Embrapa-Hortaliças, Brasília, 113p. 2000.

ROBESON, J. R.; JALAL, M.A.F.SIMPSON, R. B. Methods for identifying cercosporin-degrading microorganisms. **US n. PI 5.262.306**. 1993.

ROCA, W.N.; MROGINSKI, L. *A cultivo de tejidos em la agricultura: Fundamentos e aplicações*. Cali: **CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical**. 1991.

SILVA, M.F.; CAVALCANTE, M.A.; POROCA, D.M.; LIMA, D.M. Cultivo e esporulação de *Cercospora caribaea* e *Cercospora henningsii*, agentes causais de manchas foliares em mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Brasil, v.13, p. 54-58. 1988.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS - TACO. Versão II. 2 ed. Campinas: **NEPA-UNICAMP**, 113p. 2006.

UPCHURCH, R.G. Genetic Regulation of Cercosporin Production in *Cercospora kikuchii*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urbana, v. 72, n.12. 1995.

VIGLIAR, R.; SDEPANIAN, V.L.; FAGUNDES-NETO. U. Biochemical profile of coconut palms planted in an irland region. **Journal of Pediatrics**. v. 82, p.308-312, 2006.

YAMAMOTO, S.; NAWATA, E. *Capsicum frutescens* L. In southeast and East Asia and its Dispersal Routes into Japan. **Economic Botany**. New York, v.59, n. 1, p. 18-28, 2005.

## 5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CERCOSPORINA E INOCULAÇÃO EM GENÓTIPOS DE PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS

Aline da Silva Santos; Mailson Monteiro do Rêgo; Elizanilda Ramalho do Rêgo; Lucas Chaves Cavalcante; Karmita Thainá Correia Ferreira

### RESUMO

A cercosporina é uma toxina que provoca queima das folhas e é produzida por fungos do gênero *Cercospora*. Assim, o objetivo do trabalho foi à extração e quantificação da cercosporina de *C. capsici* cultivada em diferentes meios, com e sem geleificante, bem como avaliar a reação de genótipos de pimentas a toxina cercosporina em folhas destacadas de pimenteiras ornamentais. Isolados de *Cercospora capsici* foram cultivados em placas de Petri, e em erlenmeyer de 250 mL, contendo cinco diferentes meios de cultura com e sem geleificante. As placas de Petri foram transferidas para um desumidificador por 60 dias para secagem e os erlenmeyers permaneceram sob agitação por 30 dias a 120 rpm. Após a secagem foi definido o melhor tempo de incubação para extração da toxina. A determinação da concentração da cercosporina foi realizada pelo método de bradford. Em seguida procedeu-se a inoculação da toxina nos genótipos de pimenteiras do Banco ativo de pimenteiras ornamentais da Universidade Federal da Paraíba através da metodologia de folha destacadas, utilizando sete genótipos de pimenteiras ornamentais: UFPB 77,3; UFPB 390; UFPB 449; UFPB 132; UFPB 131; UFPB 348 e UFPB 358. Para as avaliações dos genótipos foi estabelecida a melhor concentração para expressão dos sintomas utilizando diferentes concentrações de toxina fúngica filtro-esterilizada [0, 10, 20, 30, 40, 50% (v/v)]. Estabelecida a melhor concentração, as folhas dos genótipos foram inoculadas com a toxina. O tempo ideal de incubação dos micélios macerados cultivados em meio com geleificante junto com a solução extratora Tris-HCl em pH 6,8 foi de 24 horas. Os meios à base de leite de coco (LCO) e extrato de folha de pimenteira (PA) com e sem geleificante apresentaram as maiores produções de toxina. Os isolados cultivados no meio ágar-água com geleificante também produziram quantidades de cercosporina estatisticamente iguais aos dos isolados cultivados nos meios LCO e PA com geleificantes. No teste de média da incidência de lesão nas folhas de pimenteiras quanto a ação de diferentes concentrações de cercosporina, as concentrações 40 e 50% apresentaram as maiores percentagens de lesões nas folhas destacadas de pimenteira. O efeito da infiltração foi observado em maior intensidade em quatro genótipos: UFPB 77,3; UFPB 449; UFPB 348 e UFPB 390, mostrando-se sensíveis à infiltração da toxina. Os genótipos UFPB 131, UFPB 132 e UFPB 358 apresentaram a menor quantidade de folhas lesionadas por cercosporina, mostrando tolerância à toxina.

**Palavras-chave:** *Capsicum* spp.; *Cercospora capsici*; toxina; seleção de genótipos.



## ABSTRACT

### EXTRACTION AND QUANTIFICATION CERCOSPORIN AND INOCULATION IN CHILI GENOTYPES ORNAMENTAIS

The cercosporin is a toxin that promote the leaf blight and fungi of cercospora leaf spot genre produce it. Thus A cercosporina é uma toxina que provoca queima das folhas e é produzida por fungos do gênero *Cercospora*. Thus, the aim of this work was the extraction and quantification of the cercosporin of *C. capsici* grown in diferente ways, with and without gelling, and assess the reaction of chili genotype the cercosporin toxin in leaves of ornamental chili plants. Secluded of *Cercopsora capsici* was grwn in Petri dishes, and in erlenmeyer of 250mL, containing five different way of colect with and without gelly. The petri dishes was transferred for a dehumidifier for 60 days until it be dry, and the erlenmeyers staided stirring for 30 days at 120 rpm. After the drying, it defined the better time of incubation for the toxin extraction. the determination of cercosporin concentration was realized by bradform method. After that is did the inoculation of the toxin in genotypes of chili plants of the active Bank of ornamental chili of the Federal University of Paraíba, by methodology detached leaves, using seven genotypes of ornamental chili, 77,3; 390; 449; 132; 131; 348 e 358. For the genotypes rating was established the better concentration for the expression of the symptoms using different concentrations of the filter-sterilized [0, 10, 20, 30, 40, 50% (v/v)]. Established the better concentration, the genotypes leaves inoculated with the toxin. The ideal time of incubation of macerated mycelia grown with gelly, with the extrated solution Tris-HCl in pH 6,8 was 24 hours. The coconut milk way (LCO) and leaf extract (PA) with and without gelly showed the bigger concentration of toxin. The isolated grown in agar water way with gelly also produced the same qantity of cercospoorin. On average test incidence of injury in the leaves of pepper as the action of different concentrations of cercosporin concentrations 40 and 50% had the highest percentage of injuries in detached leaves of pepper. The effect of leakage was observed in greater intensity in four genotypes 77.3; 449; 348 and 390, being sensitive to the toxin infiltration. Genotypes 131, 132 and 358 showed the least amount of damaged leaves per cercosporin, showing tolerance toxin.

**Keywords:** *Capsicum* spp; *Cercospora capsici*; Toxin; selection of genotypes.

## 5.1 INTRODUÇÃO

As pimentas (*Capsicum* spp.) fazem parte da família das solanáceas e têm como centro de origem o continente Americano. Estas plantas são utilizadas na farmacologia, na culinária, como ornamentais e têm grande importância agrícola por serem utilizadas em saladas e temperos. *Capsicum* spp. também tem grande importância socioeconômica, pois proporcionam o desenvolvimento da agricultura familiar e a fixação da mão-de-obra no campo (YAMAMOTO e NAWATA, 2005; BENTO et al., 2007).

As pimenteiras são acometidas por várias doenças que comprometem a sua produtividade e qualidade e assumem diferentes graus de importância na cultura, dependendo da época do plantio, do estado nutricional e da cultivar cultivada (LOPES et al., 2011). Tais doenças podem ser provocadas por alguns agentes biológicos como bactérias, fungos, nematóides e vírus que geram grandes prejuízos na produção e no beneficiamento das pimentas. O controle dessas doenças é realizado principalmente por produtos químicos de forma inadequada, o que pode possibilitar a presença de resíduos de agrotóxicos nos frutos da cultura (BRASIL, 2013).

Dentre as doenças fúngicas, a cercosporiose é considerada uma das doenças mais importantes dos *Capsicum* das regiões tropicais por causar lesões acinzentadas e desfolha prematura da planta, caso ocorra uma alta severidade da doença. Os sintomas podem também ser observados no caule, ramos e pedúnculos dos frutos, onde as lesões tendem a ser maiores e mais alongadas (MATSUOKA et al., 1996 e AGRIOS 2005). Esta doença é causada pelo fungo *Cercospora capsici* Heald & Wolf encontrada em cultivos de todo os continentes, principalmente em regiões tropicais, com temperaturas entre 18 a 25 °C e umidade relativa acima de 90%.

Recentemente foram relatadas a presença de outras espécies de *Cercospora* infectando algumas espécies de *Capsicum*: o *Cercospora apii* Fresen isolado de *Capsicum chinense* Jacq., em Minas Gerais (NICOLI et al., 2011) e o *Cercospora capsicigena* Bhartiya, R. Dubey & S.K. Singh encontrado na Índia, Laos e Tailândia (PHENGSIINTHAM et al., 2013).

As espécies verdadeiras de *Cercospora*, como as espécies citadas acima, são caracterizadas pela produção de um metabolito secundário de origem policetídeo pertencendo ao grupo químico das perilenoquinonas chamado toxina cercosporina de coloração vermelha (ASSANTE et al. 1977; FAJOLA, 1978 e BATCHVAROVA et al., 1992). Essa toxina tem capacidade de absorver energia luminosa e, na presença de luz, torna-se excitada adquirindo

capacidade de reagir com outras moléculas, principalmente o oxigênio. Este, ao reagir com a cercosporina, é convertido em espécies reativas de oxigênio, que são altamente tóxicas e podem interagir e danificar macromoléculas como DNA (DAUB e BRIGGS, 1983).

A cercosporina é essencial para o sucesso da patogênese de seus hospedeiros por desempenhar um papel importante na expressão da doença em diversos hospedeiros. Segundo Daub e Chung (2007), a cercosporina não é absolutamente necessária para a infecção, porém, é um fator de virulência que aumenta significativamente a quantidade e a gravidade da doença.

Devido à cercosporina participar ativamente na patogênese da doença, esta poderia ser útil para estabelecimento de metodologias de seleção de plantas resistentes ao patógeno, uma vez que alguns trabalhos relatam a exposição de folhas de plantas a esta toxina em ambiente controlado, resultando em queima das folhas (DAUB e CHUNG, 2007). No entanto, várias proteínas são liberadas por fungos fitopatogênicos com diferentes funções metabólicas, tanto no auxílio à infecção quanto na patogênese do hospedeiro. Assim, o objetivo do trabalho foi a extração e quantificação de cercosporina de *C. capsici* cultivada em diferentes meios com e sem geleificante; avaliar concentrações da toxina e discriminar genótipos de pimentas tolerantes à toxina cercosporina em folhas de pimenteiras.

## **5.2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os trabalhos foram desenvolvidos no laboratório de Biotecnologia do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II, Areia - PB.

### **5.2.1 Cultivo do fungo e extração de proteína**

O isolado fúngico foi obtido de órgãos infectados, folhas, ramos e pedúnculo de pimenteiras cultivadas em estufas do CCA/ UFPB, Campus II, Areia - PB e cultivado em placas de Petri contendo cinco diferentes meios de cultura com geleificante: Leite de coco (100 mL de leite de coco “Sococo” + 10 g de dextrose + 17 g de ágar + 900 mL de água destilada); Água de coco (100 mL de água de coco maduro natural + 10 g de dextrose + 17 g de ágar + 900 mL de água destilada); Suco V8 (200 mL de suco V8 “Campbell” + 17 g de ágar + 800 mL de água destilada); Pimenta (200 mL de sumo de pimenta obtido de 500 g de folhas de pimenta + 17 g de ágar + 500 mL de água destilada) e Ágar-água (100 mL de água destilada + 17 g de Agar).

O cultivo em meio líquido, sem geleificante, foi realizado colocando 100 mL dos meios: Leite de coco (100 mL de leite de coco “Sococo” + 10 g de dextrose + 900 mL de água destilada); Água de coco (100 mL de água de coco maduro natural + 10 g de dextrose + 900 mL de água destilada); Suco V8 (200 mL de suco V8 “Campbell” + 800 mL de água destilada); Pimenta (200 mL de sumo de pimenta obtido de 500 g de folhas de pimenta + 500 mL de água destilada) e Ágar-água (100 mL de água destilada) em erlenmeyer de 250 mL, mais três disco de micélio do fungo. Os meios foram mantidos no escuro sob agitação por 30 dias 120 rpm.

Os isolados cultivados em placas de Petri, contendo meios com geleificante, foram mantidos em BOD a  $20 \pm 2$  °C com fotoperíodo de 12 horas até a completa cobertura do meio pelo fungo (60 dias). As placas então foram transferidas para um desumidificador até a completa secagem do meio de cultura.

Após a secagem, os meios foram raspados e colocados em almofariz para maceração em nitrogênio líquido, onde 0,5 mg do macerado foi transferido para microtubos de *Eppendorf* de 2 mL. Nos microtubos com o macerado foram adicionados 1,5 mL de solução extratora [Tris- HCL, pH 6,8 (0,2 M)].

O primeiro meio a secar foi o leite de coco, e assim o primeiro a passar por raspagem e maceração em nitrogênio líquido dentro de almofariz. Após a maceração 0,5 mg do macerado foi transferido para microtubos tipo *Eppendorf* de 2 mL e foi adicionado 1,5 mL de solução extratora Tris-HCl, pH 6,8 (0,2M).

Para definir o tempo de incubação para extração da cercosporina foram definidos três tempos de incubação: 0; 12 e 24h a 5°C. Passado os tempos, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 min a 4°C.

Os sobrenadantes obtidos após as centrifugações foram transferidos para outros microtubos limpos, completando o volume de 2 mL e passando por nova centrifugação para limpeza do material. Após a extração as amostras foram mantidas em *freezer*.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições compostos de quatro tubos por tempo de incubação. Os dados obtidos foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ , e submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Genes (CRUZ, 2013).

Definido o melhor tempo de incubação para extração da proteína, procedeu-se a extração dos demais isolados seguindo os mesmos procedimentos citados acima.

Os isolados cultivados em meios líquidos passaram por filtração em papel filtro e secos em bancada por 20 min. Em seguida, os micélios secos foram macerados em nitrogênio líquido e 0,5 mg do pó foi transferido para microtubos de 2 mL. Aos microtubos foram adicionados 1,5 mL de solução extratora [Tris- HCl, pH 6,8 (0,2M)] e estes foram incubados a 5°C por 12 h, prosseguindo com centrifugação a 14000 rpm por 30 min a 4°C.

Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para microtubos novos, completando o volume para 2 mL e passando por nova centrifugação para limpeza do material. Após a extração as amostras foram mantidas em *freezer*.

A determinação da concentração da toxina cercosporina foi realizada pelo método de Bradford (1976) utilizando uma curva padrão de Albumina do Soro Bovino (BSA).

Para quantificação da concentração da cercosporina foi preparada uma curva padrão com 20 µL de uma Solução de BSA a 1 mg/mL e, o reagente bradford (Azul-Brilhante de Coomassie G250) como corante. A partir dessa solução, precedeu-se uma série de diluições para a obtenção das demais concentrações e uma amostra que serviu de branco, que foi preparada através da adição de 100 µL de água destilada e 900µL do reagente de bradford em um microtubo.

As amostras foram preparadas através da diluição de 100 µL de amostra em 900 µL do reagente de bradford em microtubos. Em seguida, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e procedeu-se as medições em Absorvância de 595 nm ( $A=595\text{nm}$ ).

A quantificação das amostras foi realizada com auxílio de um espectrofotômetro modelo Spectrophotometer Bel Photonics SP 2000 UV.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições composto de quatro placas por meio de cultura e três leituras de absorvância por placa. Os dados obtidos foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ , e submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Genes (CRUZ, 2013).

### **5.2.2 Inoculação de proteínas totais de cercosporina em plantas de pimenteiras ornamentais em condições de laboratório**

A inoculação da toxina nos genótipos de pimenteiras do Banco ativo de pimenteiras ornamentais da Universidade Federal da Paraíba foi realizada através da metodologia de folhas destacadas, utilizando sete genótipos de pimenteiras ornamentais da coleção de

pimenteiras da UFPB cujos códigos são os seguintes: UFPB 77,3; UFPB 131; UFPB 132; UFPB 348; UFPB 358; UFPB 390 e UFPB 449.

Para as avaliações dos genótipos, inicialmente, realizou-se a seleção da melhor concentração da toxina fúngica filtro-esterilizada [0, 10, 20, 30, 40, 50% (v/v)] para expressão dos sintomas em uma amostra composta de folhas sadias de genótipos de pimenteira cultivados em casa de vegetação e que apresentavam sintomas característicos da doença. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis concentrações e uma amostra composta. Cada repetição compreende quatro placas de Petri com quatro folhas cada.

As folhas coletadas foram lavadas em água corrente e detergente neutro, secas em papel toalhas e desinfestadas em álcool 70%, hipoclorito (1:1) e uma tripla lavagem em água destilada, deionizada e autoclavada. Após a desinfestação, as folhas foram submetidas à inoculação. Para isso foi pipetado sobre a folha 5 µL de cada concentração. As folhas foram incubadas em câmara úmida dentro de BOD a 22 °C em 12 h de fotoperíodo por 72 h observando a presença de lesões.

Estabelecida a melhor concentração, as folhas dos genótipos foram destacadas e submetidas à desinfestação com álcool 70% e hipoclorito (1:1 v/v) e incubadas seguindo os mesmos passos citados anteriormente.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições e sete genótipos (tratamentos). As repetições são compostas de quatro placas contendo quatro folhas cada.

Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  e submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott- knott a 5% de probabilidade com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

### **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise do tempo ideal de incubação dos micélios macerados cultivados em meio geleificante, junto com a solução extratora Tris-HCl em pH 6,8 mostrou que o aumento do tempo de incubação promove acréscimo na quantidade de proteína extraída, de zero a 2,02 µg/mL de toxina (zero e 24 horas respectivamente).

Em contrapartida observou-se que há necessidade de incubação por maior tempo quando se pretende extrair a cercosporina de fungos cultivados em meios com geleificante em Tris-HCl 6,8, o que não ocorre em meios líquidos, uma vez que o tempo de 12 horas de

incubação em escuro é suficiente para a extração da toxina fúngica em meio líquido (ALFENAS et al., 1991).

O meio líquido, por permanecer em constante agitação, proporciona maior contato da superfície micelial com os nutrientes contidos no meio, contribuindo para o aumento de massa micelial e maior produção de metabólitos, bem como para o aumento da superfície de contato das hifas com a solução extratora colaborando para a redução do tempo de extração (ROSADO et al., 2002).

Nas análises da quantidade de toxinas extraídas nos dois diferentes meios de culturas, observou-se efeito altamente significativo nas variáveis meios: sem e com geleificante ( $P < 0,001$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Análises de variância da quantidade de toxina cercosporina extraídas do fungo *Cercospora capsici* cultivado em meios a base de água e leite de coco, suco V8, pimenta e água, com e sem geleificante. Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.

FV	GL	Meio sem geleificante	Meio com geleificante
		Quadrados médios	
Tratamentos	4	5,305 **	6,87 **
Resíduo	15	0,166	0,236
Total	19		
CV		16,14	16,88

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

No meio de cultivo LCO e P-A sem e com geleificante observou-se uma maior produção de toxina (Tabela 2). A superioridade do leite de coco na quantidade de toxina produzida pode ser explicada pelo alto teor de nutriente como o cálcio e gorduras totais (HENÃO, 1991; TATO, 2006).

O cálcio promove a indução da cercosporina e a gordura concentra a toxina junto à colônia impedindo a sua expansão (CHUNG, 2003) e o Leite de coco com ágar contribui para a identificação de fungos micotoxígenos por meio da produção de pigmentação específica no meio de cultura quando a micotoxina está presente (LIN e DIANESE, 1976).

O meio V8 contribuiu para a produção de cercosporina, porém, em quantidades inferiores aos obtidos nos meios ACO, LCO e P-A. Isso, porque o meio V8 favorece a esporulação e desfavorece a produção de cercosporina. Fato comprovado por Griffin (1994) e Chug (2013). A indução da esporulação nesse meio foi relatada por vários autores como Loch (1975) em *C. capsici*, Brunelli et al. (2006) em *Cercospora zea maydis*, Souza, (2007) em *Cercospora coffeicola*.

O isolado cultivado no meio A-A com geleificante, também produziu quantidades de cercosporina estatisticamente iguais aos dos isolados cultivados nos meios LCO e PA com geleificantes, mesmo possuindo pequenas quantidades de fósforo, ferro, potássio, cloro, iodo, cálcio, celulose, anidrogactose e proteínas, corroborando com Koshikumo et al. (2014) que também conseguiram induzir a produção de cercosporina em cercosporas de milho no meio A-A.

**Tabela 2.** Valores médios da quantidade de toxina cercosporina extraída do fungo *Cercospora capsici* cultivado em meios a base de água e leite de coco, suco V8, pimenta e água, com e sem geleificante. Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.

Tratamentos	Meio sem geleificante	Meio com geleificante
	Ptn amostra µg/ml	
ACO	5,35b	1,143b
LCO	15,11 <sup>a</sup>	16,788a
PA	10,91 <sup>a</sup>	13,598a
V8	3,35c	2,413b
Água	0,0b	12,745a

\*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, teste de média Scott-Knott.

Na Tabela 3 pode-se observar que os efeitos da concentração da toxina fúngica foram altamente significativo ( $p < 0,001$ ), indicando variação entre as doses. Na variável seleção dos genótipos quanto a resistência à toxina cercosporina (SGRTC), observou-se na análise de variância, que houve efeito significativo ( $P < 0,05$ ) mostrando que existe variação entre os genótipos quanto à reação à toxina fúngica (Tabela 3).

**Tabela 3.** Análises de variância da Incidência de folhas de pimenteiros lesionadas por diferentes concentrações da toxina cercosporina (IFLDC) e da seleção de genótipos quanto a ação da toxina cercosporina (SGATC). Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.

FV	IFLDC		SGATC	
	GL	QM	GL	QM
Concentrações	5	56,63 **	6	8,17*
Resíduo	18	0,19	21	2,44
Total	23		27	
CV (%)		7,89		48,72

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade. \*Significativo a 5% de probabilidade.



No teste de média da IFLDC, as concentrações 40 e 50% apresentaram as maiores percentagens de lesões nas folhas destacadas de pimenteira (Tabela 4), onde, à medida que se aumentou a concentração da toxina, maior foi a percentagem de folhas lesionadas. Isso devido à alta toxidez da cercosporina nas células vegetais que, quando em presença de membrana, a toxina pode provocar a peroxidação dos lipídeos da membrana celular, conduzindo a sua ruptura e à morte das células vegetais, ocasionando a formação de lesões nas folhas vegetais (DAUB e CHUNG, 2007).

Nas avaliações dos genótipos quanto a tolerância à cercosporina foi utilizada a concentração de 50%. As médias dos genótipos quanto a IFLDC apresentaram-se após as 72 horas (Tabela 4). O efeito da infiltração foi observado em maior intensidade em quatro genótipos: UFPB 77,3; UFPB 449; UFPB 348 e UFPB 390 (Tabela 4), que se mostraram sensíveis à infiltração da toxina (Figura 1: A e B), efeitos da infiltração da cercosporina foi observado em folhas de dois cultivares de arroz (BATCHVAROVA et al., 1992).

Alguns trabalhos utilizaram toxinas fúngicas na avaliação da eficiência de produção de lesões e da reação de genótipos. A resistência fitopatogênica, tem sido relatada com eficiência em culturas como tabaco, algodoeiro, maracujazeiro amarelo, amendoim-bravo (THANUTONG et al., 1983; MEHTA et al., 2001; FLORES, 2008).

A eficiência da patogenicidade das cercosporas está relacionada à cercosporina porque esta toxina causa a ruptura da membrana e morte celular e com isso, permite a liberação de nutrientes requeridos pelo fungo que tem crescimento e esporulação no interior do hospedeiro (DAUB et al., 2013).

A utilização de toxinas fúngicas na seleção de genótipos resistentes a doenças torna-se uma alternativa eficiente, principalmente em fungos com dificuldade de esporulação e crescimento lento *in vitro*, uma vez que estes fatores dificultam o isolamento e a purificação da colônia e a eficiência da inoculação dos fungos nas plantas. Muitos pesquisadores relataram que as espécies do gênero *Cercospora* apresentam crescimento lento em meios de cultura artificiais (SILVA et al., 1988; DEL PELOSO et al., 1989; QUEIROZ e MENEZES, 1993; RIBEIRO et al., 1997; ROSA e MENEZES, 2000; ÁVILA e PITELLI, 2004; SWAMY et al., 2012).

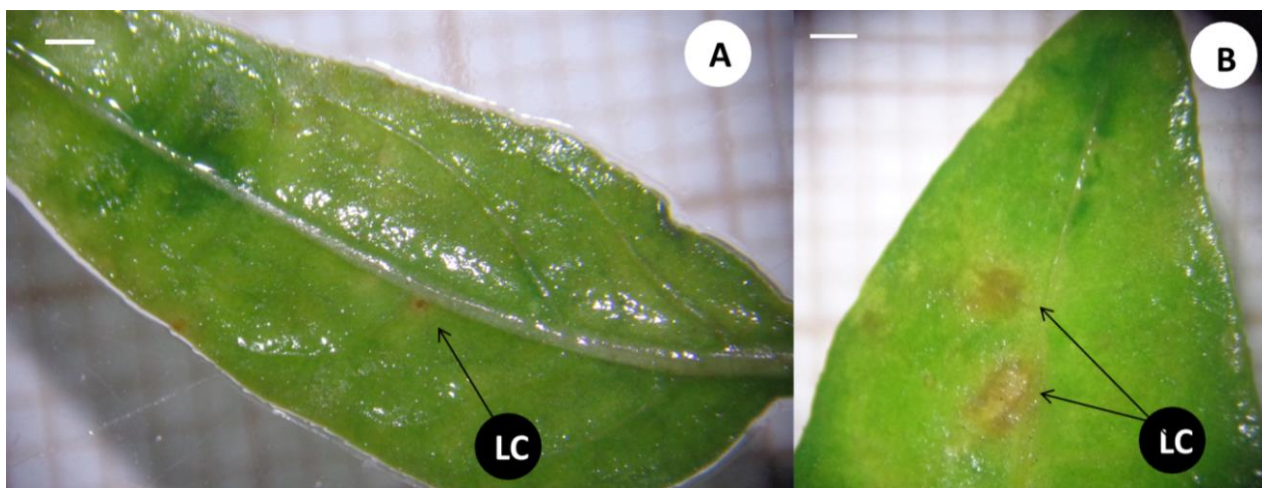
Todos os genótipos apresentaram sensibilidade à toxina, porém, em níveis variados (Tabela 4). Os genótipos UFPB 131; UFPB 132 e UFPB 358 apresentaram a menor quantidade de folhas lesionadas por cercosporina, mostrando que existe variabilidade entre os genótipos do Banco de Pimenteira da Universidade Federal da Paraíba, podendo assim utilizar

estes genótipos em programas de melhoramento de pimenteiras visando resistência à cercosporiose.

**Tabela 4.** Valores médios da Incidência de folhas de pimenteiras lesionadas por diferentes concentrações da toxina cercosporina (IFLDC) e da Seleção de genótipos quanto a ação da concentração de 50% da toxina cercosporina (SGACT). Areia-PB, UFPB/CCA, 2014.

IFLDC		SGACT	
Concentração	Médias das Lesões	Genótipos	Médias das Lesões
	%		%
0	0e	UFPB 77.3	25,01a
10	8,83d	UFPB 131	3,15b
20	29,41c	UFPB 132	6,28b
30	63,23b	UFPB 348	12,50a
40	86,76a	UFPB 358	7,84b
50	89,06a	UFPB 390	20,31a
		UFPB 449	20,31a

\*Grupos de médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade no teste de Scott-Knott. \*\* Seleção de genótipos utilizou-se a concentração de 50%



**Figura 1.** Sintomas de queimas provocadas por cercosporina em folha de pimenteira. A. Folha com lesões provocada pela toxina cercosporina (LC). Escala= 1mm. B Detalhe de lesões da toxina cercoporina (LC) na folha inoculada. Escala= 1mm.

Programas de melhoramento de pimenteiras visando à resistência a diferentes doenças são muitos: Candole et al. (2012); Pereira et al. (2011); Melo et al. (2011), porém, não foram encontrados na literatura trabalhos visando seleção de genótipos resistentes à cercosporiose apesar dos danos econômicos causados na produção de pimenteira, isso devido a dificuldade de purificação e esporulação do fungo *in vitro*.

#### 5.4 CONCLUSÕES

É necessário um tempo de incubação de 24 horas em presença de Tris-HCl pH 6,8 a 5°C para a extração de proteínas em meio com geleificante;

Nos dois meios de cultura com e sem geleificante os meios à base de leite de coco e pimenta apresentaram maior produção de cercosporina;

As concentrações da toxina a 40 e 50% proporcionaram as melhores representatividades dos sintomas nas folhas de pimenteira;

Os genótipos UFPB 131, UFPB 132 e UFPB 358 apresentaram tolerância à infiltração da proteína fúngica.

## 5.5 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. Plant pathology. 5th ed. Amsterdam: *Elsevier Academic*, 952p. 2005.
- ASSANTE, G.; LOCCI, R.; CAMARDA, L.; MERLINI L.; NASINI, G. Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. **Phytochemistry**, Milano. USA, v. 16, p. 243-347. 1977.
- BATCHVAROVA, R.B.; REDDY, V.S.; BENNETT, J. Cellular resistance in rice to cercosporin, a toxin of *Cercospora*. **Phytopathology**, Oxford, Inglaterra, v. 82, n. 6, p. 642-646. 1992.
- BENTO, C.S.; SUDRE, C. P.; RODRIGUES, C.; RIVA, R. M.; PEREIRA, E.M.G. Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre genótipos de pimentas. **Scientia Agraria**, Curitiba, Brasil, v.8, n.2, p. 149-156. 2007.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária Gerência Geral de Toxicologia (ANVISA)**. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) - Relatório anual (2012-2013).
- BRUNELLI, K.R.; FAZZA, A.C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L.E.A. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zeae-maydis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, Brasil, v. 32, p. 92-94. 2006.
- CANDOLE, B. L.; CONNER, P. J.; JI, P. Evaluation of phytophthora root rot-resistant *Capsicum annuum* accessions for resistance to phytophthora foliar blight and phytophthora stem blight. **Agricultural Sciences**. Wuhan, China, v.3, n.5, p.732-737. 2012.
- CHUNG, K.R., Involvement of calcium/calmodulin signaling in cercosporin toxin biosynthesis by *Cercospora nicotianae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 69, p. 1187-1196. 2003.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: Versão Windows; Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 382p. 2013.
- DAUB, M. E.; BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by cercosporin. **Plant Physiology**, Glasgow, Reino Unido, v. 71, n. 4, p. 763-766. 1983.
- DAUB, M.E. e CHUNG, K-R. Cercosporin: A Phytoactivated Toxin in **Plant Disease Journal**, Saint Paul, USA. Online. APSnet. 2007.
- DEL PELOSO, M.C., FERNANDES, C.D., FILGUEIRAS, A.T. & CHAVES, G.M. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, Brasil, v.14, p.41-44. 1989.
- FAJOLA, A.O. Cercosporin, a phytotoxina from *Cercospora* spp. **Physiological Plant Pathology**. Maryland, EUA, v.13, p. 157-164. 1978.

FLORES, P. S. **Filtrado de culturas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflora* e ácido fusárico na seleção in vitro de maracujazeiro amarelo.** 2008. 73f Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais. 2008.

GRIFFIN, D.H. **Spore dormancy and germination. Fungal physiology**, 2nd edn. Wiley-Liss, New York, p. 375–398. 1994.

HENÃO, L.M.M., **Cultivo de tejidos vegetales.** Medellin: Universidad Nacional de Colômbia. 1991.

KOSHIKUMO, E.S.M.; ALVES, E.; PINHO, R.G.V. Induction and detection of toxin in *Cercospora zeina* and *Cercospora sorghi* f. sp. *Maydis*. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, Brasil, v. 9, n.1, p.31-35. 2014

KRISHNAMURTHY, K., RAJAGOPALAN, R., SWAMINATHAN, M., SUBRAHMANYAN, V., The chemical composition and nutritive value of coconut and its products. **Journal Food Science**. Van Buren, Brasil, v. 7, p. 365– 370. 1958.

LIN MT, DIANESE JC. A coconut-agar medium rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, Oxford, Inglaterra, v. 66, p. 1466-1470. 1976

LOPES, C.A.; HENZ, P.G.; REIS, A. **Doenças das Pimenteiras e seu Controle.** In: RÊGO, E.R.; FINGER, L.F.; RÊGO, M.M. Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum spp.*). Areia, Universidade Federal da Paraíba. 223p. 2011.

MATSUOKA, K.; VANETTI, C.A.; COSTA, H.; PINTO, C.M.F. Doenças causadas por fungos em pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.184, p.64-66. 1996

MEGHVANSI, M. K.; KHAN, M.H.; GUPTA, R.; VEER, V. Identification of a new species of *Cercospora* causing leaf spot disease In *Capsicum assamicum* in northeastern India. **Research in Microbiology**. Reino Unido, Oxford, Inglaterra, v.164, p. 894 – 902. 2013.

MEHTA, Y.R., & ARIAS, C.A.A. Herança da resistência a *Stemphylium solani* e insensibilidade a sua fitotoxina em cultivares de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 26:761-765. 2001.

MELO, O. D.; MALUF, W.R.; GONÇALVES, R.J. S.; GONÇALVES NETO, A.C.; GOMES, L. A. A.; CARVALHO, R. C. Triagem de genótipos de hortaliças para resistência a *Meloidogyne enterolobii*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, Brasil, v.46, n.8, p.829-835. 2011.

MITCHELL, T.K.; CHILTON, W.S.; DAUB, M.E. Biodegradation of the polyketide toxin cercosporin, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 68, n. 9, p. 4173-4181. 2002.

NICOLI, A., ZAMBOLIM, L., NASU, E.G.C., PINHO, D.B., PEREIRA, O.L., CABRAL, P.G.C., ZAMBOLIM, E.M., 2011. First report of *Cercospora apii* leaf spot on *Capsicum chinense* in Brazil. **Plant Disease Journal**, Saint Paul, USA, v. 95. 1994.

PEREIRA, M.J.Z.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; SUSSEL, A.A.B.; SALA, F.C.; COSTA, C.P.; BOITEUX, L.S. Reação de genótipos de *Capsicum* e de progênies de cruzamentos interespecíficos a isolados de *Colletotrichum acutatum*. **Horticultura Brasileira**. Brasília, Brasil, v. 29, n. 4, p. 569-576. 2011.

PHENGSIINTHAM P, BRAUN U, MCKENZIE EHC, CHUKEATIROTE E, CAI L, HYDE KD. Monograph of cercosporoid fungi from Thailand. **Plant Pathology & Quarantine**, Chiang Rai, Tailândia, v.3, p. 19–90. 2013.

THANUTONG, P. ; FURUSAWA, I.; YAMAMOTO, M. Resistant tobacco plants from protoplast-derived calluses selected for their resistance to *Pseudomonas* and *Alternaria* toxins. **Theoretical and Applied Genetics**. Heidelberg, Alemanha, v. 66, p. 209-215. 1983.

YAMAMOTO, S.; NAWATA, E. *Capsicum frutescens* L. in Southeast and East Asia, and its dispersal routes into Japan. **Economic Botany**. Western Cape, África do Sul, v. 59, p. 18-28. 2005.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

O fungo *Cercospora capsici* é o causador de manchas em espécies de pimenteiras, cultivadas em estufas no município de Areia-PB;

O método de isolamento direto foi o mais eficiente para o isolamento de *C. capsici* e o indireto mais efetivo para ramos;

Os meios à base de leite e água de coco e à base de suco V8 expressaram pigmentação vermelha, característica da toxina cercosporina;

O meio de cultura água-ágar proporcionou o maior índice de velocidade de crescimento micelial;

O P-A proporcionou o maior tamanho de massa micelial;

Os meios leite e água de coco apresentaram as maiores concentrações de cercosporina quando extraídos por KOH 5N;

Para a extração de proteínas em meio com geleificante é necessário um tempo de incubação de 24 horas em presença de Tris-HCl pH 6,8 a 5 °C;

Nos dois meios de cultura com e sem geleificante os meios à base de leite de coco e pimenta apresentaram uma maior produção de toxina quando extraído por Tris-HCl pH 6,8;

As concentrações de proteínas totais a 40 e 50% proporcionaram as melhores representatividades dos sintomas nas folhas de pimenteira e podem ser utilizadas na discriminação de genótipos;

Os genótipos UFPB 131, UFPB 132 e UFPB 358 apresentaram tolerância à infiltração da proteína fúngica;

A toxina cercosporina foi eficiente na seleção de genótipos de pimenteiras ornamentais.